



様式6

論文目録

報 告 番 号	乙 薬 第 3 4 号	氏 名	大 西 基 代
学位論文題目	コーヒ <sup>と</sup> ー酸その構造類似体および漢方方剤の 活性酸素に対する抑制作用と作用機作		
公刊論文			
1. Inhibition <i>in vitro</i> linoleic acid peroxidation and haemolysis by caffeoyltryptophan. M. Ohnishi, H. Morishita, S. Toda, Y. Yase and R. Kido. <i>Phytochemistry</i> , 47, 1215-1218(1998)			
2. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis. M. Ohnishi, H. Morishita, H. Iwahashi, S. Toda, Y. Shirataki, M. Kimura and R. Kido. <i>Phytochemistry</i> , 36, 579-583(1994)			
3. Action of curcuminoids on the hemolysis and lipid peroxidation of mouse erythrocytes induced by hydrogen peroxide. S. Toda, M. Ohnishi, M. Kimura and K. Nakashima. <i>J. Ethnopharmacology</i> , 23, 105-108(1988)			
4. 糖尿病治療薬の活性酸素に対する作用 大西基代、戸田静男、菅田良仁、東家一雄、黒岩共一、木村通郎. <i>医学のあゆみ</i> , 158, 447-448(1991)			
5. Actions of chinese herbal medicines Keishibukuryo-gan and Tougakujyouki-to on the hemolysis and lipid peroxidation of mouse erythrocytes induced by hydrogen peroxide. S. Toda, M. Ohnishi and M. Kimura. <i>J. Ethnopharmacology</i> , 27, 221-225(1989)			
6. 芳香性生薬の活性酸素に対する作用(1) 戸田静男、大西基代、木村通郎. <i>和漢医薬学会誌</i> , 7, 372-373(1990)			
公刊参考論文			
1. Sensitive spectrophotometric determination of tetraphenylboron and tetraphenylarsonium with ethidium bromide. T. Higuti, M. Ohnishi, N. Arakaki, S. Nakasima and M. Yokota. <i>Analytical Biochemistry</i> , 92, 462-465(1979)			
2. Effects of phenolcarboxylic acids on superoxide anion and lipid peroxidation induced by superoxide anion S. Toda, M. Kimura and M. Ohnishi. <i>Planta Medica</i> , 57, 8-10(1991)			
3. 活性酸素によるレシチンリポソーム過酸化に対する桂枝茯苓丸、桃核承気湯の抑制作用。戸田静男、大西基代、木村通郎、戸田知子 <i>和漢医薬学会誌</i> , 9, 131-136(1992)			
4. Inhibitory effects of Keishi-bukuryo-gan on peroxidation of erythrocyte ghost by active oxygen. S. Toda, M. Ohnishi, M. Kimura and T. Toda. <i>J. Med. Pharm. Soc.WAKAN-YAKU</i> , 10, 210-214(1993)			
5. Inhibitory effects of eugenol and related compounds on lipid peroxidation induced by active oxygen. S. Toda, M. Ohnishi, M. Kimura and T. Toda. <i>Planta Medica</i> , 60, 282(1994)			
6. Inhibitory effects of Keishi-bukuryo-gan, a traditional herbal medicine, on lipid peroxidation of brain homogenate. S. Toda, M. Ohnishi, M. Tsutuki and Y. Yase. <i>Phytotherapy Res.</i> , 10, 77-78(1996)			
その他(総説・単行本等)			
なし			



## 様式7

## 論文内容要旨

報告番号	乙 薬 第 34 号	氏 名	大 西 基 代
学位論文題目	コーヒー酸とその構造類似体および漢方方剤の活性酸素に対する抑制作用と作用機作		
<p>内容要旨 本研究では植物に含有されるフェノール性物質に注目し、活性酸素に対する作用の検討を行った。特にトリプトファンとコーヒー酸がアミド結合した化合物である Caffeoyltryptophan については、本研究がはじめて生理活性を報告し、活性酸素に対する作用とその作用機作について考察を行った。その結果、強力なラジカル不活化作用、<math>O_2^-</math> の不活化作用、リノール酸ミセルの脂質過酸化抑制作用、赤血球の脂質過酸化および溶血抑制作用を認め、また、Caffeoyltryptophan の示す抗酸化作用が強力なラジカル捕捉作用に基づくことを示した。Caffeoyltryptophan の示す抗酸化作用は代表的な抗酸化剤である <i>all-rac</i>-<math>\alpha</math>-トコフェロールと同程度であった。同様に、コーヒー酸とその構造類似体について検討した結果、コーヒー酸、クロロゲン酸 および 3,5-Dicaffeoylquinic acid(3,5-DCQA) に強力なラジカル不活化作用、<math>O_2^-</math> の不活化作用、リノール酸ミセルの脂質過酸化抑制作用、赤血球の脂質過酸化および溶血抑制作用を認めた。3,5-DCQA は <i>all-rac</i>-<math>\alpha</math>-トコフェロールより強力なラジカル不活化作用を示し、コーヒー酸、クロロゲン酸 は <i>all-rac</i>-<math>\alpha</math>-トコフェロールより強力な脂質過酸化および溶血抑制作用を示した。また、クロロゲン酸に四塩化炭素により誘導される <i>in vivo</i> における脂質過酸化の抑制作用を認めた。電子顕微鏡による観察から、脂質過酸化により赤血球は破壊され溶血が起こることを明らかにし、コーヒー酸が脂質過酸化抑制により赤血球の形状を維持し、強力に溶血現象を抑制していることも明らかにした。さら</p>			

に、コーヒー酸、クロロゲン酸 および 3,5-DCQA の示した作用が、強力なラジカル捕捉作用に基づくことを明らかにした。トリプトファンが今回の実験系においてはまったく活性を示さなかったことと、コーヒー酸を2個もつ 3,5-DCQA が最も強力な活性を示したことからコーヒー酸構造類似体の示すラジカル不活化作用の機序を示し、コーヒー酸類がラジカル反応の開始反応および連鎖反応の抑制により溶血、肝障害などを防御することを示した。生薬の薺金に含まれ、フェルラ酸、桂皮酸および *p*-クマル酸が構成成分であるクルクミノイドが赤血球の脂質過酸化抑制作用を示すことを明らかにした。しかし、フェルラ酸、桂皮酸および *p*-クマル酸には赤血球の脂質過酸化抑制作用も、四塩化炭素により誘導される *in vivo* における脂質過酸化の抑制作用も認められなかった。このことから、コーヒー酸類とは異なり、クルクミノイドはフェルラ酸とは作用機序が異なることが示唆された。

漢方薬は成人病や婦人病などでその役割が強く求められているが、それらの疾患には活性酸素が関与すると言われている動脈硬化や血管障害などの疾患が多いことから、治療に用いられている漢方薬の効能と含有する抗酸化成分とは無縁ではないと考えられる。活性酸素が発症に関与していると言われている糖尿病の治療薬である八味地黄丸、白虎加人参湯にラジカル不活化作用、赤血球の脂質過酸化が関与している瘀血症の治療薬である桃核承気湯、桂枝茯苓丸、当帰芍薬散にラジカル不活化作用、 $O_2^-$  の不活化作用、赤血球の脂質過酸化および溶血抑制作用を認めた。桃核承気湯、桂枝茯苓丸の示す作用がラジカル捕捉作用に基づいていることを明らかにした。



コーヒー酸とその構造類似体および漢方方剤  
の活性酸素に対する抑制作用と作用機作

1998年

大西基代

コーヒールとその構造類似体および漢方方剤  
の活性酸素に対する抑制作用と作用機作

1998年

大西基代



## 目次

第1章	緒言	-----	1
第2章	コーヒー酸とその構造類似体の活性酸素に対する抑制作用 と作用機作	-----	6
2. 1.	序論	-----	6
2. 2.	実験材料	-----	7
2. 2. 1.	3,5-DCQA の単離	-----	7
2. 2. 2.	Caffeoyltryptophan について	-----	8
2. 2. 3.	クルクミノイドについて	-----	8
2. 3.	DPPH ラジカルの不活性化	-----	8
2. 3. 1.	実験方法	-----	8
2. 3. 2.	結果	-----	8
2. 4.	$O_2^-$ の不活性化	-----	12
2. 4. 1.	実験方法	-----	12
2. 4. 2.	結果	-----	12
2. 5.	リノール酸ミセルの $O_2^-$ 依存性脂質過酸化に対する 抑制作用	-----	14
2. 5. 1.	実験方法	-----	14
2. 5. 2.	結果	-----	15
2. 6.	$H_2O_2$ による赤血球の脂質過酸化および溶血に対 する抑制作用	-----	18
2. 6. 1.	実験方法	-----	18
2. 6. 1. 1.	実験動物	-----	18
2. 6. 1. 2.	赤血球懸濁液の調製	-----	18

2.6.1.3.	脂質過酸化および溶血の測定	19
2.6.1.4.	溶血抑制効果の電子顕微鏡による観察	19
2.6.2.	結果	20
2.6.2.1.	脂質過酸化度、溶血度の経時的変化と $H_2O_2$ の添加濃度による変化	20
2.6.2.2.	脂質過酸化および溶血に対するコーヒー酸 類の抑制作用	22
2.6.2.3.	脂質過酸化および溶血に対するクルクミノ イドの抑制作用	25
2.6.2.4.	溶血抑制効果の電子顕微鏡による観察	28
2.7.	$CCl_4$ による肝脂質過酸化に対する抑制作用	30
2.7.1.	実験方法	30
2.7.1.1.	肝障害マウスの作成	30
2.7.1.2.	肝の過酸化脂質量の測定	30
2.7.2.	結果	31
2.7.2.1.	クロロゲン酸の抑制効果の投与時間による 影響	32
2.7.2.2.	肝脂質過酸化に対するコーヒー酸の抑制 作用	32
2.8.	考察	35
第3章	漢方方剤の活性酸素に対する抑制作用	39
3.1.	序論	39
3.2.	実験材料	40
3.2.1.	漢方方剤エキス、生薬エキスの調製	40

3.3.	DPPH ラジカルの不活性化	41
3.3.1.	実験方法	41
3.3.2.	結果	41
3.4.	$O_2^-$ の不活性化	43
3.4.1.	実験方法	43
3.4.2.	結果	43
3.5.	$H_2O_2$ による赤血球の脂質過酸化および溶血に対 する抑制作用	46
3.5.1.	実験方法	46
3.5.2.	結果	46
3.6.	$H_2O_2$ に対する分解作用	48
3.6.1.	実験方法	48
3.6.2.	結果	48
3.7.	$\bullet OH$ に対する消去作用	49
3.7.1.	実験方法	49
3.7.2.	結果	50
3.8.	考察	52
第4章	総括	55
4.1.	コーヒー酸とその構造類似体の抑制作用と作用機作	55
4.2.	漢方方剤の抑制作用	59
謝辞		60
引用文献		61
付記		72



## 略語

ATP : adenosine 5'-triphosphate

AX : alloxan

BHA : butylated hydroxyanisole

BSA : bovine serum albumin

B.W. : body weight

$\bullet\text{CCl}_3$  : trichloromethyl radical

DMPO : 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide

DPPH : 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

DCQA : dicaffeoylquinic acid

EDTA : ethylenediamine tetraacetic acid

ESR : electron spin resonance

GSH : glutathione

GSH $\bullet$ Px : glutathione peroxidase

3-HAT : 3-hydroxyanthranilic acid

Hb : hemoglobin

Hb —  $\text{Fe}^{2+} \cdots \text{O}_2$  : perferryl ion

m-HHA : *m*-hydroxyhippuric acid

HIV : human immunodeficiency virus

HPLC : high performance liquid chromatography

HX : hypoxanthine

IC<sub>50</sub> : half inhibitory concentration

L $\bullet$  : lipid radical

LDL : low density lipoprotein

LH : lipid

LOO $\bullet$  : peroxy radical

MDA : malondialdehyde

NBT : nitroblue tetrazolium

NMR : nuclear magnetic resonance spectroscopy

PBS : phosphate buffered saline

SDS : sodium dodecyl sulfate

$^1\text{O}_2$  : singlet oxygen

$\text{O}_2^-$  : superoxide

$\bullet\text{OH}$  : hydroxyl radical

SOD : superoxide dismutase

STZ : streptozotocin

TBA : thiobarbituric acid

TBAV : thiobarbituric acid value

TCA : tricarboxylic acid

TEP : 1,1,3,3-tetraethoxypropane

XOD : xanthine oxidase

## 試薬

リノール酸(99.9%)、SOD(EC 1.2.3.2)、XOD(EC 1.15.1.1)、  
コーヒー酸、クロロゲン酸、桂皮酸、*p*-クマル酸、  
クルクミン、フェルラ酸、プロトカテキュ酸、  
*dl*- $\alpha$ -トコフェロール、バニリン酸、BSA ----- シグマ  
EDTA、DPPH、NBT、過酸化水素 ----- 和光純薬  
ルブロール PX ----- ナカライテスク

## 第1章 緒言

1969年にMcCordとFreidovichは、酸素の1電子還元で生じる $O_2^-$ が生体反応で生成することを発見し、さらにこれを消去する酵素を赤血球より分離、精製し、SODと名付けた<sup>1)</sup>。この発見を契機とし、酸素障害の作用分子となる活性酸素に関する生理、病態意義について多方面から活発に研究が行われてきた<sup>2)~6)</sup>。活性酸素は生理的に重要な代謝に寄与し、ある時には生理活性物質の産生に働き、また殺菌効果を示したり、さらに抗癌作用にも関与し、我々の生命の営みに対して重要な役割を果たしてくる一方、コントロールされていないランダムな生体組織における活性酸素の生成は、脂質過酸化反応などを通して生体に障害を与えると考えられ、後者の作用が注目され論議されている<sup>7)~9)</sup>。多くの活性酸素やフリーラジカルの寿命は極めて短く、それらの産生局所において種々の生体成分と反応するため、組織や細胞で活性酸素を速やかに分解消去することが生体保護の面から重要である(Fig.1)。

クロロゲン酸は、植物に含有されるフェノール性化合物の一種でコーヒー酸とキナ酸のエステルである(Fig. 2)。コーヒーの成分として研究が進められ<sup>10、11)</sup>、ジャガイモ<sup>12)</sup>、サツマイモ<sup>13)</sup>、等の多くの植物の常成分として含まれていることも確認、定量されている(Table 1)<sup>14)~18)</sup>。一方、病原菌の侵入に対する抵抗手段として植物内にクロロゲン酸が蓄積されることが報告され、植物におけるストレスへの対抗因子であると考えられ研究がすすめられている<sup>19)</sup>。また、薬用植物においてはクロロゲン酸の含有量と薬理作用との関連性について検討され<sup>20~22)</sup>、プロポリスのマクロファージの拡散および移動の促進作用が含有されるクロロゲン酸やその誘導体であるDCQA(Fig. 2)によると報告されている<sup>23)</sup>。このように、食品として大量に摂取され、また薬用植物として使用されていることを勘案すると、クロロゲン酸、DCQAなどのコーヒー酸類に焦点をあてることは興味深いと考える。



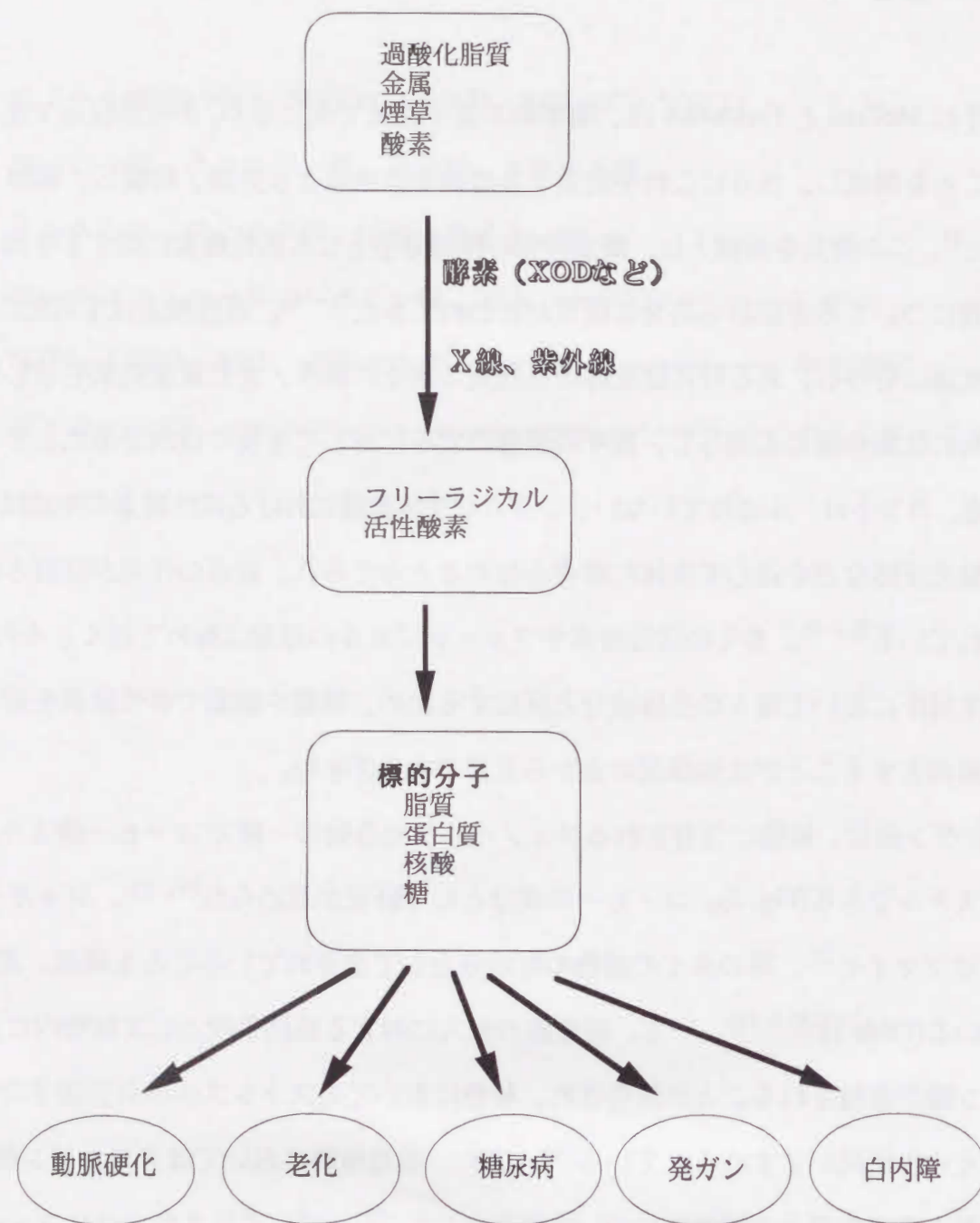


Fig. 1 活性酸素の生成と生体への影響

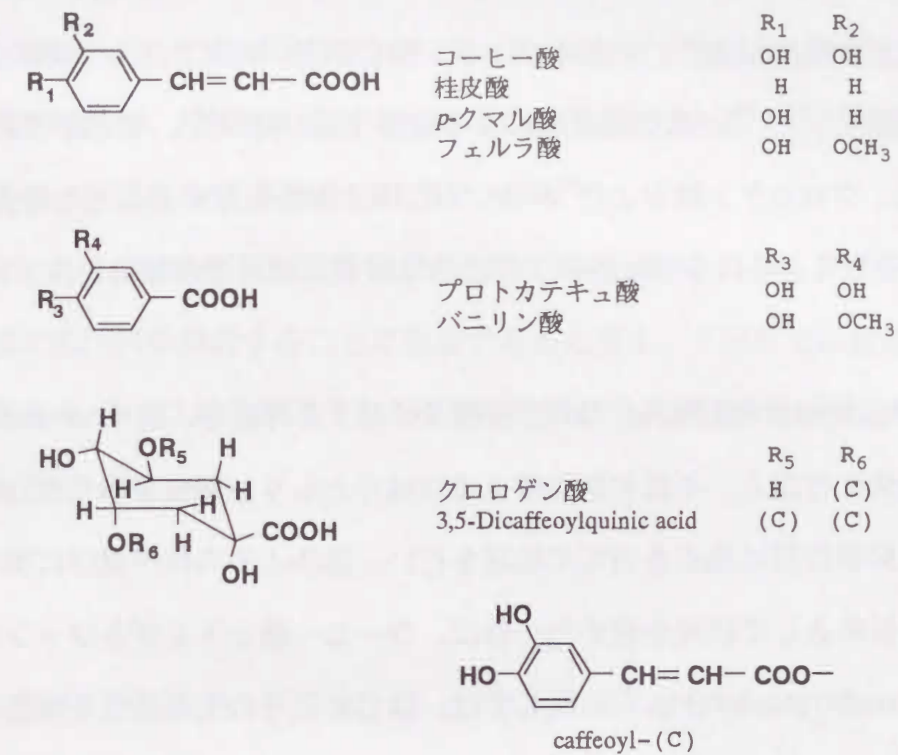


Fig. 2 コーヒー酸類の化学構造

Table 1 植物および食品におけるクロロゲン酸の含有量

植物および食品	含有量
ジャガイモ	3.4-14 mg/100 g <sup>14)</sup>
茶葉	559-674 mg/100 g <sup>15)</sup>
リンゴ	89 mg/100 g <sup>16)</sup>
コーヒー豆	4.88 g/100 g <sup>17)</sup>
ヨモギ葉	476 mg/100 g <sup>17)</sup>
リンゴジュース	12-34 mg/100 ml <sup>16)</sup>
コーヒー	260 mg/1 cup <sup>18)</sup>

クロロゲン酸の生体反応への作用については、プロスタグランジン代謝におけるリポキシゲナーゼ活性の阻害<sup>24)</sup>、エピネフィリン酸化阻害<sup>25)</sup>、ビタミンA酸化阻害<sup>26)</sup>、抗ウィルス作用<sup>18、27~29)</sup>、次亜塩素酸による殺菌作用の抑制<sup>30)</sup>、などが報告されている。さらに、クロロゲン酸およびDCQAが抗HIV活性を有することも報告されている<sup>31~33)</sup>。そして、これらの反応の中には活性酸素との関連が指摘されているものもある。

そこで、今回コーヒー酸類(Fig. 2)の活性酸素に対する作用を、まず *in vitro* におけるラジカル不活化作用と、不飽和脂肪酸を構成成分としリン脂質を多く含む赤血球膜の脂質過酸化抑制作用に焦点を当てて検討を行い、活性とその作用機序に関する知見を得ることを目的として研究を進めた。特に、コーヒー酸とトリプトファンがアミド結合した Caffeoyltryptophan(Fig. 3)に関しては、はじめてその生理活性を報告する。

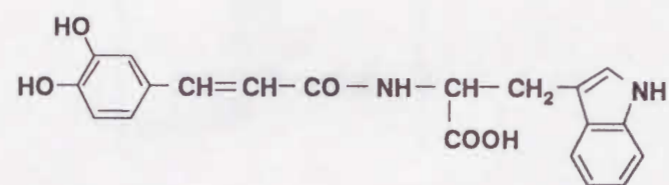


Fig. 3 Caffeoyltryptophan の化学構造

一方、漢方薬は成人病や婦人病などでその役割が強く求められているが、それらの疾患には、活性酸素が関与するといわれている動脈硬化や血管障害などの疾患が多いことから、治療に用いられている漢方薬の効能と含有している抗酸化成分とは無縁ではないと考えられる。その中でも毛細血管床における微小循環障害である瘀血症は、血液粘度上昇によると考えられ<sup>34)</sup>、その血液粘度決定因子である赤血球変形能は、赤

血球膜の脂質過酸化反応により生じるMDAにより低下されている<sup>35)</sup>。また、ある臓器、細胞の局所に過酸化脂質が生じれば、当然その部位に慢性的な障害を生じ特定の疾病になるが、局所より血液中に流失し血管病変などの二次的病変の原因となることも多く、糖尿病の合併症はその代表である<sup>36)</sup>。

以上のことより、瘀血症や糖尿病などの治療に用いられている漢方方剤や生薬の活性酸素に対する作用を検討することは重要であると考え、本研究では前述のコーヒー酸類と同様に *in vitro* におけるラジカル不活化作用と赤血球の脂質過酸化抑制作用に注目し実験を行った。



## 第2章 コーヒー酸とその構造類似体の活性酸素に対する抑制作用と作用機作

### 2. 1. 序論

植物の抗酸化成分として知られるクロロゲン酸の誘導体である 3,5-DCQA をヨモギから分取し、コーヒー酸およびその関連化合物の活性酸素に対する作用を、ラジカル捕捉、 $O_2^-$  の不活化、リノール酸の脂質過酸化反応、赤血球膜の脂質過酸化反応および溶血現象について検討した。また *in vivo* においては、ラジカル反応が引き金となると考えられている  $CCl_4$  による肝脂質過酸化に対する効果の検討を行った。

また、コーヒーの成分として単離、同定されている Caffeoyltryptophan は、コーヒー豆に約 110 mg/100g 含まれることが報告されているが<sup>37, 38)</sup>、その生理活性については報告されていない。コーヒー酸とトリプトファンがアミド結合したもので(Fig. 3)、その抗酸化作用に着目し、活性酸素に対する作用を上記と同様に検討した。

さらに、種々の脂質過酸化反応を抑制することが報告されている<sup>39, 40)</sup>フェルラ酸の誘導体であるクルクミン、4-Hydroxycinnamoyl(feruloyl)methane、bis-(4-Hydroxycinnamoyl)methane(Fig.4)の赤血球膜の脂質過酸化および溶血に対する作用を検討した。

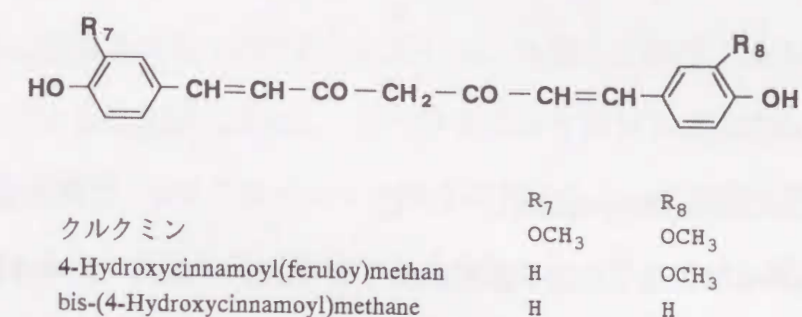


Fig. 4 クルクミノイドの化学構造

### 2. 2. 実験材料

#### 2.2.1. 3,5-DCQA の単離

3,5-DCQA は、森下らの方法<sup>41)</sup>に従い高速液体クロマトグラフィーを用いて *Artemisia montana* PAMPAN. の葉から単離した。

乾燥した *Artemisia montana* PAMPAN. の葉から 70% イソプロパノールで 3 回抽出し、 $N_2$  気流下で減圧濃縮した水溶液を、0.45  $\mu m$  のフィルター(Milipore製)で濾過し、試料とした。HPLC 装置は日立高速液体クロマトグラフィー(655 形ポンプ、638-41 形可変モニター)を用いた。分析用カラムは、zorbax 社の ODS(150  $\times$  4.6 mm)を用い、10 mM リン酸 - メタノール混液を展開溶媒とし、メタノール濃度を 0 ~ 10 分 10%、10 ~ 15 分 10 ~ 33%、15 ~ 25 分 33%、25 ~ 45 分 33 ~ 70% と変化させ、流速 1.0 ml/min で展開し、325 nm の波長で検出した。分取用カラムは YMCA 社、SH-343-5、S5-120A ODS(250  $\times$  20mm)を用いた。10 mM リン酸 - メタノール混液を展開溶媒とし 0 ~ 85 分 38%、85 ~ 140 分 50%、90 ~ 180 分 80% と変化させ、流速 3.3 ml/min で展開し、325 nm で検出した。3,5-DCQA は保持時間 85 分に溶出した。分取した標品は、和歌山大学森下比出子教授の標品と NMR スペクトルを比較し、3,5-DCQA と



同定した。

### 2.2.2. Caffeoyltryptophan について

Caffeoyltryptophan は、森下比出子教授により ロブスター種コーヒーの生豆より単離、同定されたもの<sup>37)</sup>を供与して頂き用いた。

### 2.2.3. クルクミノイドについて

クルクミンの誘導体である 4-hydroxycinnamoyl (feruloyl) methane、bis-(4-hydroxycinnamoyl) methane は、関西鍼灸短期大学戸田静男教授により *Curcuma longa* L. の根茎から単離同定されたもの<sup>39)</sup>を用いた。

## 2. 3. DPPHラジカルの不活性化

### 2.3.1. 実験方法

ラジカル不活性化の測定は、Blois の方法<sup>42)</sup>に従った。すなわち、0.1 mM DPPH エタノール溶液 3 ml に、エタノールに溶解した試料溶液 0.5 ml を添加し 517 nm における吸光度を測定した。DPPH ラジカルが還元され、減少する吸光度を 20 分間測定し、吸光度の減少度をラジカル不活性化の指標とし、以下の式よりラジカルの減少度 (%) を算出した。

$$\text{ラジカルの減少度 (\%)} = \frac{\text{試料無添加時の吸光度} - \text{試料添加時の吸光度}}{\text{試料無添加時の吸光度}} \times 100$$

### 2.3.2. 結果

DPPH はエタノールに溶解すると化学的に安定なラジカルを形成し、517 nm に吸収を示す。ラジカルが不活性化されると 517 nm における吸光度の減少が起こる。これは、

安定なラジカルを脂質ラジカルの代わりに用いて、抗酸化剤がラジカル捕捉型であるのか、何個のラジカルを不活化することができるのかを調べる方法である。

DPPH 溶液に最終濃度 1  $\mu\text{M}$  のクロロゲン酸を添加すると、すぐ吸光度の減少が起こり、5 分後にはほとんど吸光度の減少が認められなかった。クロロゲン酸の濃度を 10  $\mu\text{M}$ 、100  $\mu\text{M}$  と増加させると吸光度の減少度は増加し、共に 5 分後にはほとんど吸光度の減少は認められなかった(Fig. 5)。そこで、20 分間に減少する吸光度を測定し、コーヒー酸類のラジカル減少度の濃度依存性について検討を行った。

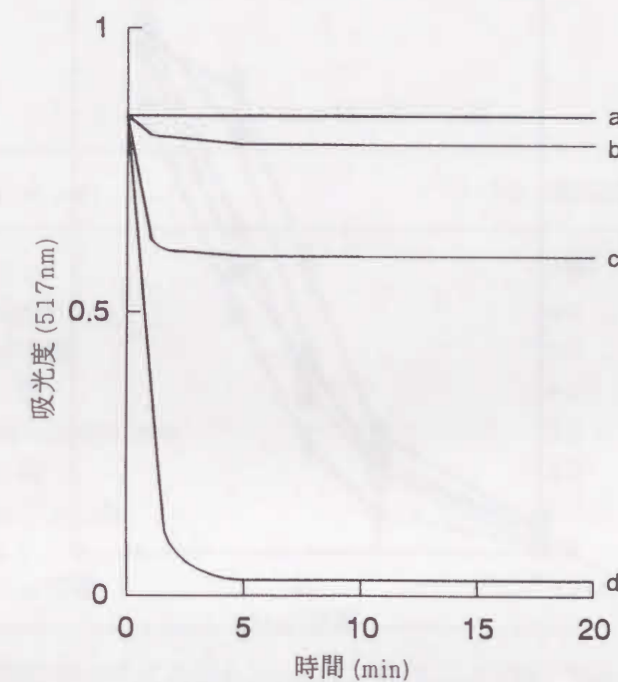


Fig. 5 クロロゲン酸との反応によって減少する 517nm(DPPHラジカル由来)の吸光度の経時変化  
DPPH : 86  $\mu\text{M}$   
クロロゲン酸 : a ; 0  $\mu\text{M}$ 、b ; 1  $\mu\text{M}$ 、c ; 10  $\mu\text{M}$ 、d ; 100  $\mu\text{M}$



コーヒー酸、クロロゲン酸、3,5-DCQA、Caffeoyltryptophan、*all-rac-α*-トコフェロールは1～50 μMの範囲で濃度依存的に DPPH ラジカルを捕捉した(Fig. 6)。最終濃度10 μMの添加で、コーヒー酸、クロロゲン酸、3,5-DCQA、Caffeoyltryptophan は、それぞれ  $34.6 \pm 0.3\%$ 、 $28.4 \pm 0.2\%$ 、 $49.6 \pm 4.1\%$ 、 $32.8 \pm 0.6\%$  のラジカルの減少度を示した。*all-rac-α*-トコフェロール、アスコルビン酸は、それぞれ  $18.7 \pm 0.0\%$ 、 $18.7 \pm 0.2\%$  であった。桂皮酸、*p*-クマル酸、バニリン酸にはラジカル捕捉活性は認められなかった。最終濃度100 μMの添加においてもラジカルの減少度はそれぞれ  $2.5 \pm 1.7\%$ 、 $6.7 \pm 2.3\%$ 、 $11.6 \pm 4.1\%$  であった。

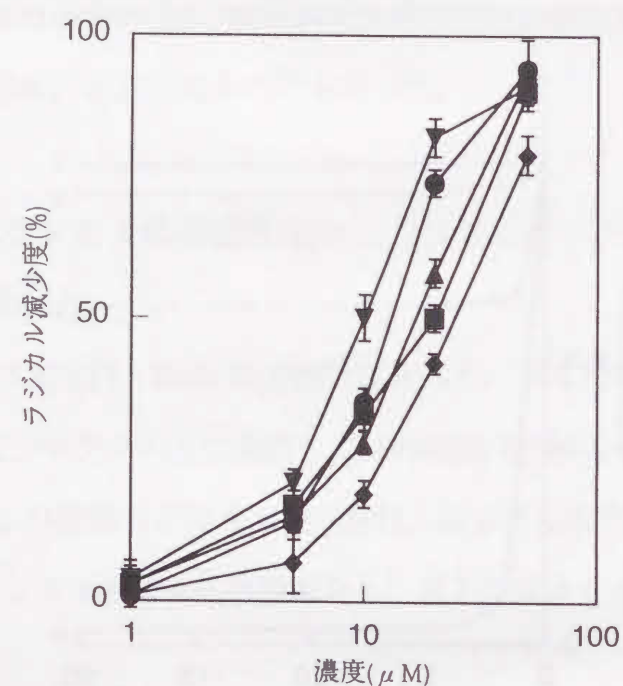
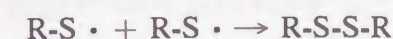


Fig. 6 DPPHラジカルの特異吸収(517nm)に対するコーヒー酸類の減少作用。517nmにおける20分間の吸光度減少を測定し、ラジカル減少度(%)を算出した。Means  $\pm$  S.E. (n=4)

- Caffeoyltryptophan
- コーヒー酸
- ▲ クロロゲン酸
- ▼ 3,5-Dicaffeoylquinic acid
- ◆ *all-rac-α*-トコフェロール

1分子のシステイン(RS-H)は



の反応により、1分子の DPPH ラジカルを非ラジカル体に変えることが報告されている<sup>42)</sup>。そこで、システインとの比較より各化合物1分子が何個のラジカルを捕捉することができるのかを検討した。コーヒー酸、クロロゲン酸、Caffeoyltryptophan 1分子は約4個のラジカルを、3,5-DCQA、プロトカテキュ酸は約6個のラジカルを不活性化することが示された(Table 2)。

Table 2 コーヒー酸類のラジカル捕捉数の比較

化合物(10 μM)	ラジカル捕捉数 <sup>a)</sup>
システイン	1.0
Caffeoyltryptophan	4.4
クロロゲン酸	3.5
コーヒー酸	4.4
3,5-Dicaffeoylquinic acid	6.3
フェルラ酸	1.6
プロトカテキュ酸	6.5
<i>all-rac-α</i> -トコフェロール	2.4
アスコルビン酸	2.4

<sup>a)</sup> 最終濃度10 μMにおけるシステインのラジカル減少度を1.0とした時の各化合物のラジカル減少度をラジカル捕捉数として示している。

今回の結果は、他の過酸化反応系においてコーヒー酸1分子は約4.9個の脂質ラジカルと反応し、ラジカルを捕捉するという報告<sup>43)</sup>と一致している。

## 2. 4. $O_2^-$ の不活性化

### 2. 4. 1. 実験方法

今成らのキサンチン - XOD 法<sup>44)</sup>を用いて検討した。すなわち、0.05 M 炭酸ナトリウム緩衝液(pH10.2)2.4 ml に、3 mM キサンチン溶液 0.1 ml、3 mM EDTA 溶液 0.1 ml、1.5 mg/ml BSA 溶液 0.1 ml、0.75 mM NBT 溶液 0.1 ml、試料 0.1 ml を加えた反応溶液を、25°C で 10 分間インキュベートした後、XOD(0.2 U/ml)溶液 0.1 ml 加え反応を開始した。25°C で 20 分間反応させた後、6 mM  $CuCl_2$  溶液 0.1 ml を加え反応を停止させた。試料の代わりに 6 mM  $CuCl_2$  溶液 0.1 ml を先に加えて同様に操作したものを対照として、560 nm における吸光度を測定した。試料は水又はエタノールに溶解した。試料の代わりに蒸留水を用いて同様に操作したものをコントロールとして、以下の式より  $O_2^-$  の不活性化率を算出した。

$$\text{不活性化率 (\%)} = \frac{\text{コントロールの吸光度} - \text{試料の吸光度}}{\text{コントロールの吸光度}} \times 100$$

### 2. 4. 2. 結果

キサンチンが XOD により尿酸に酸化される時、 $O_2^-$  が生成する。そのとき共存する NBT が還元され、560 nm に吸収を持つジホルマザンとなる。ジホルマザン量を測定することにより、 $O_2^-$  の不活性化の指標とした。

コーヒー酸、クロロゲン酸、3,5-DCQA、Caffeoyltryptophan、アスコルビン酸は 1 ~ 50  $\mu M$  の範囲で濃度依存的に  $O_2^-$  を不活性化した(Fig. 7)。Caffeoyltryptophan の作用は、コーヒー酸、クロロゲン酸と同程度で、アスコルビン酸よりは強力であった。3,5-DCQA が最も強力な  $O_2^-$  の不活性化活性を示した(Fig. 7)。また、桂皮酸、*p*-クマル酸、フェルラ酸には、 $O_2^-$  の不活性化活性は認められなかった(Table 3)。

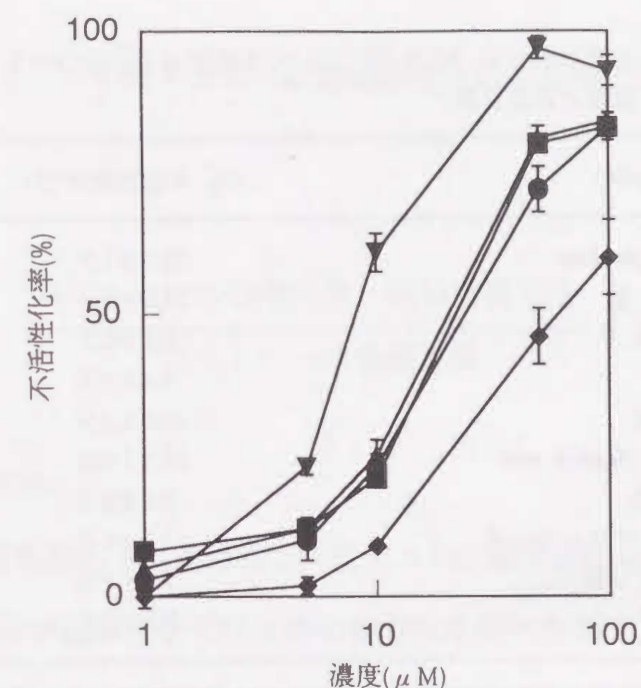


Fig. 7 キサンチン-XOD 系において生成する  $O_2^-$  とコーヒー酸類との反応性。

20 分間のジホルマザンの生成を指標として  $O_2^-$  不活性化率を算出した。

Means  $\pm$  S.E. (n=4)

- Caffeoyltryptophan
- コーヒー酸
- ▲ クロロゲン酸
- ▼ 3,5-Dicaffeoylquinic acid
- ◆ アスコルビン酸



Table 3 キサンチン - XOD 系において生成する  $O_2^-$  とコーヒー酸類との反応性

化合物(10 $\mu$ M)	$O_2^-$ 不活性化率(%)
Caffeoyltryptophan	21.3 $\pm$ 1.0
クロロゲン酸	24.9 $\pm$ 0.6
p-クマル酸	0.1 $\pm$ 0.7
桂皮酸	0.4 $\pm$ 0.5
コーヒー酸	23.0 $\pm$ 3.6
3,5-Dicaffeoylquinic acid	61.2 $\pm$ 0.2
フェルラ酸	0.1 $\pm$ 0.2
all-rac- $\alpha$ -トコフェロール	13.2 $\pm$ 1.0
アスコルビン酸	9.7 $\pm$ 1.5
トリプトファン	0.0 $\pm$ 2.1

20 分間のジホルマザンの生成を指標として、各化合物10  $\mu$ M における  $O_2^-$  の不活性化率を算出した。  
Means  $\pm$  S.E.(n=4)

## 2. 5. リノール酸ミセルの $O_2^-$ 依存性脂質過酸化に対する抑制作用

### 2.5.1. 実験方法

Tien らの方法<sup>45)</sup>に従った。30 mM NaCl(pH 7.0)中にリノール酸をボルテックスミキサーでよく攪拌して溶解させ、10 mM リノール酸原液を調製した。このリノール酸原液に 0.8% ルブロール PX と 30 mM NaCl(pH 7.0)を加えて 1.25 mM リノール酸ミセル溶液を調製した。1.25 mM リノール酸ミセル溶液(pH 7.0) 4 ml に、1 mM EDTA-  $Fe^{3+}$  混液(1.1 mM EDTA-1 mM  $FeCl_3$ ) 0.5 ml、30 mM NaCl で調製した 0.3 M アセトアルデヒド溶液(pH 7.0) 0.5 ml、試料 0.01 ml を加えた反応溶液に XOD(18.5 U/ml)溶液 0.01 ml を加え、反応を開始し、37°C で 234 nm の吸光度の増大を経時的に測定した。アセトアルデヒドの代わりに 30 mM NaCl(pH 7.0) 0.5 ml を添加したものを対照とし吸光度の測定を行った。試料は、水またはエタノール

に溶解し用いた。リノール酸ミセルの脂質過酸化反応の抑制率は、以下の式より算出した。

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{コントロールの吸光度} - \text{試料の吸光度}}{\text{コントロールの吸光度}} \times 100$$

### 2.5.2. 結果

不飽和脂肪酸が自動酸化される過程で共役ジエンが産生される。この共役ジエンは、脂肪酸ミセルの脂質が過酸化を受ける際の初期反応変化を測定するのに有効であると言われている<sup>46)</sup>。そこで、共役ジエンの生成を指標としてリノール酸ミセルの脂質過酸化反応に対する作用の検討を行った。

反応溶液に XOD を添加し反応を開始すると、234 nm の吸光度の経時的な増大が認められた(Fig. 8 a)。これは、鉄錯体の存在下でアルデヒドが XOD により酸化される際生成する  $O_2^-$  が、ミセル化したリノール酸を酸化する過程で共役ジエンを産生していることを示している。この反応に、最終濃度 10  $\mu$ M のクロロゲン酸を添加すると、共役ジエン産生の初期反応速度の抑制と、10 分間のジエン生成量の抑制が認められた(Fig. 8 b)。また、クロロゲン酸の添加濃度を 20  $\mu$ M、50  $\mu$ M と増加させると、さらに初期反応速度とジエン生成量に強い抑制が認められた(Fig. 8 c, d)。そこで、10 分間の共役ジエン量を測定し、リノール酸ミセルの脂質過酸化反応に対するコーヒー酸類の抑制作用の濃度依存性について検討を行った。

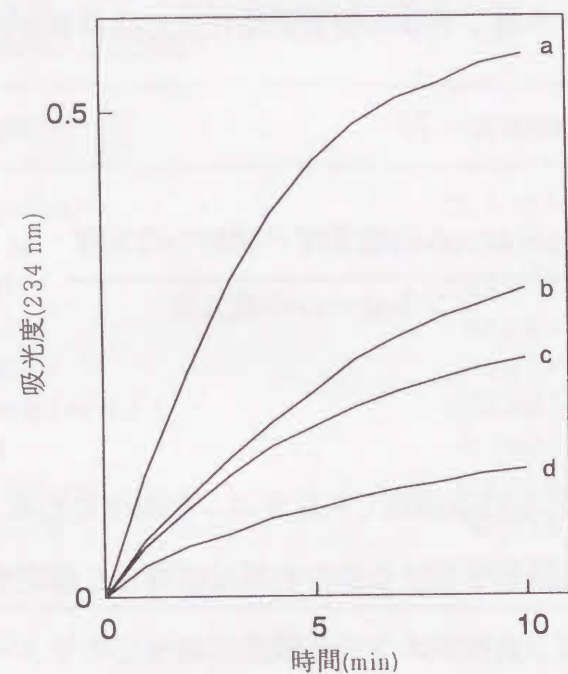


Fig. 8 共役ジエンの生成を指標とした  $O_2^-$  依存性のリノール酸過酸化反応に対するクロロゲン酸の抑制作用  
リノール酸: 1.0 mM  
クロロゲン酸: a; 0  $\mu$ M、b; 10  $\mu$ M、  
c; 20  $\mu$ M、d; 50  $\mu$ M

1 ~ 50  $\mu$ M の範囲で、濃度依存的にコーヒー酸、クロロゲン酸、3,5-DCQA、Caffeoyltryptophan はリノール酸ミセルの脂質過酸化反応を抑制した。  
Caffeoyltryptophan、3,5-DCQA の抑制作用は、コーヒー酸、クロロゲン酸よりは強力  
で、1  $\mu$ M の低濃度でも抑制率はそれぞれ  $28.5 \pm 1.8\%$ 、 $38.6 \pm 2.1\%$  であった(Fig. 9)。

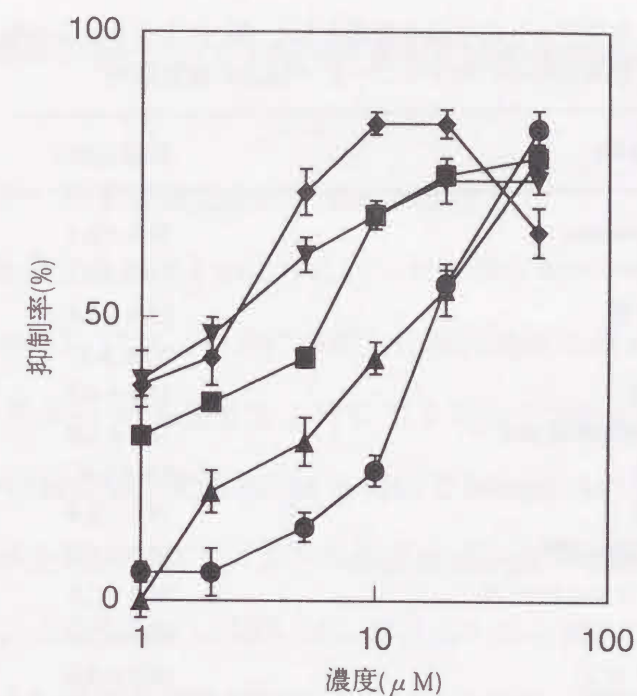


Fig. 9 共役ジエンの生成を指標とした  $O_2^-$  依存性のリノール酸過酸化反応に対するコーヒー酸類の抑制作用。  
10 分間の共役ジエンの生成を測定し、脂質過酸化の抑制率(%)を算出した。  
Means  $\pm$  S.E. (n=4)  
■ Caffeoyltryptophan  
● コーヒー酸  
▲ クロロゲン酸  
▼ 3,5-Dicaffeoylquinic acid  
◆ *all-rac-α*-トコフェロール

各化合物の 20  $\mu$ M における脂質過酸化の抑制率を Table 4 に示した。コーヒー酸、クロロゲン酸、3,5-DCQA、フェルラ酸、プロトカテキュ酸、*all-rac-α*-トコフェロールに抑制作用が認められた。今回実験を行った中で、*all-rac-α*-トコフェロールが最も強力な抑制作用を示した。桂皮酸、*p*-クマル酸、バニリン酸には、リノール酸ミセルの脂質過酸化抑制作用は認められなかった。



Table 4 共役ジエンの生成を指標とした  $O_2^-$  によるリノール酸過酸化反応に対するコーヒー酸類の抑制作用

化合物(20 $\mu$ M)	抑制率(%)
Caffeoyltryptophan	74.8 $\pm$ 2.1
p-クマル酸	1.6 $\pm$ 3.1
クロロゲン酸	55.4 $\pm$ 3.6
桂皮酸	0.2 $\pm$ 3.3
コーヒー酸	55.8 $\pm$ 4.5
3,5-Dicaffeoylquinic acid	73.5 $\pm$ 1.0
バニリン酸	8.8 $\pm$ 2.8
フェルラ酸	39.6 $\pm$ 3.4
プロトカテキュ酸	30.3 $\pm$ 3.2
all-rac- $\alpha$ -トコフェロール	84.0 $\pm$ 2.5
アスコルビン酸	48.0 $\pm$ 3.8
トリプトファン	18.0 $\pm$ 0.3
マンニトール(5 mM)	81.7 $\pm$ 1.3

10 分間の共役ジエンの生成を指標として、各化合物 20  $\mu$ M における脂質過酸化の抑制率を算出した。

Means  $\pm$  S.E.(n=4)

## 2. 6. $H_2O_2$ による赤血球の脂質過酸化および溶血に対する抑制作用

### 2. 6. 1. 実験方法

#### 2. 6. 1. 1. 実験動物

実験には、日本エスエルシーより購入した ddY 系雄性マウス(30 ~ 35 g)を用いた。

25°C の動物室で定時照射の環境下で飼育し、飼料および給水は自由に与えた。

#### 2. 6. 1. 2. 赤血球懸濁液の調製

抗凝固剤としてヘパリンを用い、エーテル麻酔下においてマウスの心より採血した。

室温で 3000 rpm 10 分間遠心し、赤血球を分離した。さらに 0.9% NaCl で数回洗浄し

た後、0.02 M PBS(pH 7.4)を用いて 10% w/v 赤血球懸濁液を調製した。

#### 2. 6. 1. 3. 脂質過酸化および溶血の測定

小友らの方法<sup>47)</sup>を改変して以下のように行った。10% w/v マウス赤血球懸濁液(0.02 M PBS pH 7.4) 0.5 ml に、エタノールに溶解した試料溶液 0.05 ml、0.02 M PBS(pH 7.4) 0.45 ml、0.6%  $H_2O_2$  1 ml を加えて、37°C で 2 時間インキュベートした。反応終了後、1500 rpm 10 分間遠心し、上清 1.5 ml を用いて Mengel らの方法<sup>48)</sup>で脂質過酸化度を、また上清 0.2 ml を用いてシアノメトヘモグロビン法<sup>49)</sup>で溶血度を測定した。脂質過酸化度の測定は、上清 1.5 ml に 10% TCA 溶液 2.0 ml を加え、1500 rpm 10 分間遠心した後、その上清 2.0 ml に 0.67% TBA 溶液 2.4 ml を加え、100°C で 5 分間加熱した。反応終了後氷冷し、530 nm における吸光度を測定した。また溶血度の測定は、上清 0.2 ml に発色試薬(KCN 0.5 mg/ml、 $K_3[Fe(CN)_6]$  0.2 mg/ml 含有)(Wako 製) 5.0 ml を加えて 5 分間室温で放置した後、540 nm における吸光度を測定した。試料の代わりに蒸留水を用いて同様の操作を行った物をコントロールとして、以下の式より、脂質過酸化および溶血の抑制率を算出した。

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{\text{コントロールの吸光度} - \text{試料の吸光度}}{\text{コントロールの吸光度}} \times 100$$

#### 2. 6. 1. 4. 溶血抑制効果の電子顕微鏡による観察

2. 6. 1. 2. と同様の操作により調整した 10% w/v マウス赤血球懸濁液(0.02 M PBS pH 7.4) 0.5 ml に、エタノールに溶解した試料溶液 0.05 ml、0.02 M PBS(pH 7.4) 0.45 ml、0.6%  $H_2O_2$  1 ml を加えて、37°C で 2 時間インキュベートした。反応終了後、電子顕微鏡用標本の作成を行った。0.1 M リン酸緩衝液で調整した 1.25% グルタルアル



デヒドにより 4℃ で 1 時間固定した。固定後 0.05 M PBS で数回洗浄した後、さらに 1% 酸化オスミウムにより 4℃ で 1 時間固定した。その後、50 ~ 100% エタノールで順次脱水し、アミールアルコールと二酸化炭素で凍結乾燥させ、金蒸着をして、25 kV で走査型電子顕微鏡(JOEL - 300 S、東京、日本)により観察を行った。

## 2.6.2. 結果

赤血球は体外に容易に取りだすことができるため、生体膜モデルとして膜の機能や構造に関する研究に頻繁に用いられてきた。赤血球にはラジカル連鎖反応の引き金となる活性酸素種を消去する酵素や物質が含まれ、二重三重に防護網が張り巡らされている。しかし、生じたラジカル量が多量であると膜の過酸化反応は進行し、ひいては溶血に至る。そこで、マウス赤血球を用いて  $H_2O_2$  によって誘導される膜の脂質過酸化と、それに伴って起こる溶血現象の形態学的変化を電子顕微鏡で観察した。

### 2.6.2.1. 脂質過酸化度、溶血度の経時的変化と $H_2O_2$ の添加濃度による変化

まず、 $H_2O_2$  の濃度を一定(0.6%)として反応時間を 0 ~ 120 分に変化させ、反応時間による脂質過酸化度および溶血現象の変化を検討した。反応時間と共に脂質過酸化度および溶血度が増加することが示された。しかし、反応時間が 80 分以降では、脂質過酸化度および溶血度共にほとんど増加しなかった(Fig. 10)。従って、反応時間を 2 時間として以下の実験を行った。また、反応時間が 20 ~ 80 分において過酸化脂質の増加が溶血の増加より早く起きていることが認められた(Fig. 10)。この現象は、脂質過酸化反応が起こってから溶血現象が起こることを示している。つまり、 $H_2O_2$  を開始剤とした今回の反応系では、膜の脂質過酸化により溶血現象が起きることを示唆している。

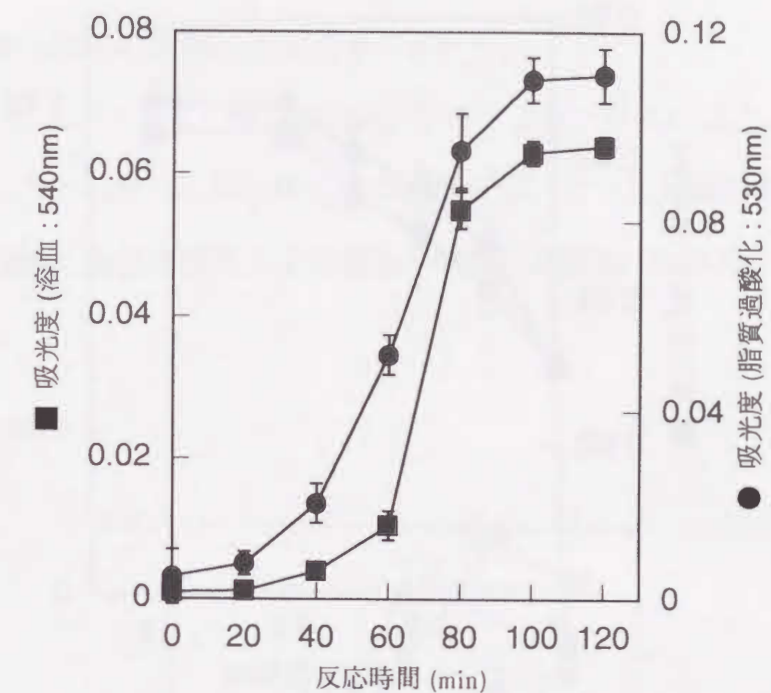


Fig.10  $H_2O_2$  によって誘導されるマウス赤血球の脂質過酸化反応および溶血の経時的変化。  
 $H_2O_2$  の添加濃度 : 0.6%  
Means  $\pm$  S.E. (n=4)  
● 脂質過酸化 ■ 溶血

次に、反応時間を一定(2 時間)として  $H_2O_2$  の添加濃度を 0 ~ 60% に変化させ、添加濃度による脂質過酸化度、溶血度の変化を検討した。 $H_2O_2$  の添加濃度が 0.4% までは、脂質過酸化および溶血に濃度依存的に増加が認められたが、0.4% と 0.6% ではほぼ同程度の脂質過酸化度および溶血度であった(Fig. 11)。従って  $H_2O_2$  の添加濃度を 0.6% として以下の実験を行った。



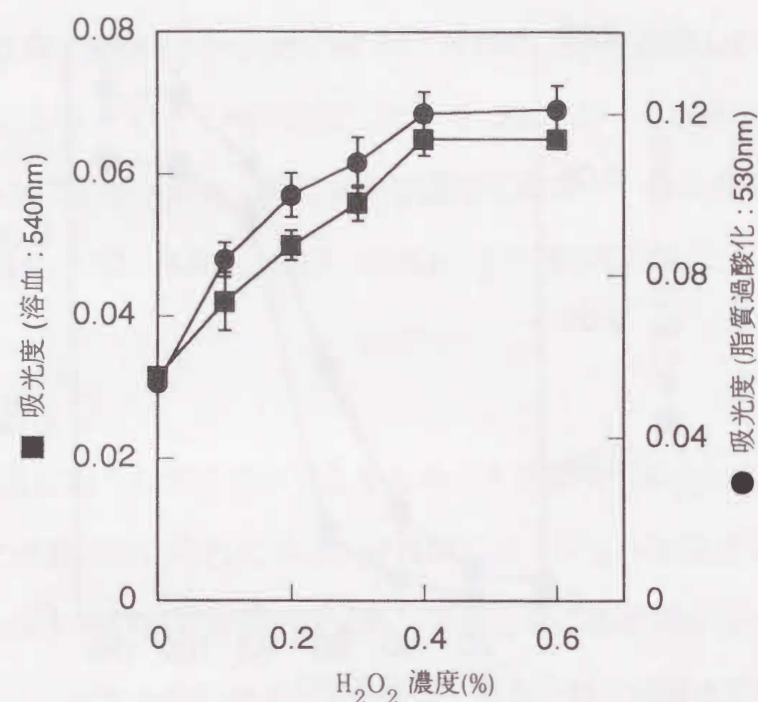


Fig. 11 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の濃度によるマウス赤血球の脂質過酸化反応および溶血の変化。  
反応時間: 2 h (37°C)  
Means  $\pm$  S.E. (n=4)  
● 脂質過酸化 ■ 溶血

#### 2.6.2.2. 脂質過酸化および溶血に対するコーヒー酸類の抑制作用

コーヒー酸、クロロゲン酸、3,5-DCQA、Caffeoyltryptophan、*all-rac*- $\alpha$ -トコフェロールは、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によって誘導される赤血球の脂質過酸化および溶血を強力に抑制した (Fig.12)。1 ~ 50  $\mu$ M の範囲で濃度依存的に脂質過酸化および溶血の抑制が認められ、脂質過酸化と溶血の抑制率はほぼ同程度であった。前述したように、今回の実験系では膜の脂質過酸化により溶血現象が起こることより、コーヒー酸、クロロゲン酸、3,5-DCQA、Caffeoyltryptophan および *all-rac*- $\alpha$ -トコフェロールが示す溶血の抑制作用

は、膜の脂質過酸化反応の抑制によると考えられる。

0.2 ~ 10  $\mu$ M までは、コーヒー酸、*all-rac*- $\alpha$ -トコフェロール共にほとんど変わらない抑制作用を示した。しかし、10  $\mu$ M 以上の濃度では、コーヒー酸の方が *all-rac*- $\alpha$ -トコフェロールより強く脂質過酸化および溶血を抑制した (Fig. 12、13)。

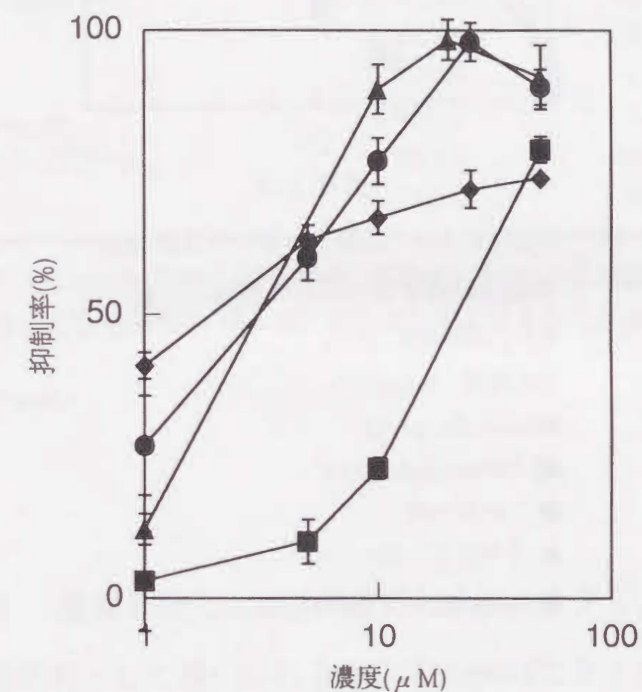


Fig. 12 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によって誘導されるマウス赤血球の脂質過酸化反応に対するコーヒー酸類の抑制作用。  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加濃度: 0.6%  
反応時間: 2 h (37°C)  
Means  $\pm$  S.E. (n=4)  
■ Caffeoyltryptophan  
● コーヒー酸  
▲ クロロゲン酸  
◆ *all-rac*- $\alpha$ -トコフェロール

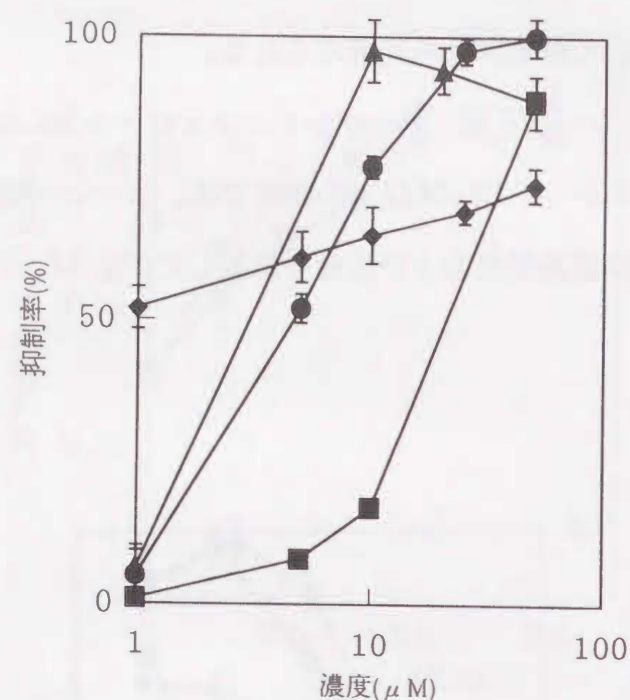


Fig. 13  $H_2O_2$  によって誘導されるマウス赤血球の溶血に対するコーヒー酸類の抑制作用.  
 $H_2O_2$  添加濃度: 0.6%  
 反応時間: 2 h (37°C)  
 Means  $\pm$  S.E. (n=4)  
 ■ Caffeoyltryptophan  
 ● コーヒー酸  
 ▲ クロロゲン酸  
 ◆ all-rac- $\alpha$ -トコフェロール

各化合物の 10  $\mu M$  における脂質過酸化および溶血の抑制作用を Table 5 に示した。桂皮酸、*p*-クマル酸、フェルラ酸、プロトカテキュ酸、バニリン酸にはほとんど脂質過酸化と溶血の抑制作用を認めなかった。桂皮酸、*p*-クマル酸、フェルラ酸、プロトカテキュ酸、バニリン酸は最終濃度 250  $\mu M$  の添加においても脂質過酸化の抑制率は、各々、 $4.9 \pm 6.9\%$ 、 $20.3 \pm 3.6\%$ 、 $2.3 \pm 2.0\%$ 、 $31.7 \pm 1.6\%$ 、 $39.8 \pm 4.8\%$  であった。また、溶血の抑制率は、各々、 $13.3 \pm 0.0\%$ 、 $2.7 \pm 2.3\%$ 、 $1.7 \pm 1.8\%$ 、 $0.3 \pm 4.3\%$ 、 $13.8 \pm 6.8\%$  であった。

Table 5  $H_2O_2$  により誘導されるマウス赤血球の脂質過酸化および溶血に対するコーヒー酸類の抑制作用

化合物(10 $\mu M$ )	抑制率 (%)	
	脂質過酸化	溶血
Caffeoyltryptophan	$23.4 \pm 5.4$	$17.0 \pm 1.5$
<i>p</i> -クマル酸	$0.2 \pm 4.3$	$1.2 \pm 4.5$
クロロゲン酸	$89.7 \pm 4.4$	$97.6 \pm 5.6$
桂皮酸	$0.3 \pm 3.1$	$1.9 \pm 1.7$
コーヒー酸	$82.6 \pm 4.3$	$83.2 \pm 8.1$
3,5-Dicaffeoylquinic acid	$56.3 \pm 5.9$	$65.6 \pm 4.8$
バニリン酸	$0.1 \pm 1.8$	$0.2 \pm 1.4$
フェルラ酸	$0.4 \pm 2.4$	$1.7 \pm 1.8$
プロトカテキュ酸	$0.0 \pm 1.5$	$3.8 \pm 5.5$
all-rac- $\alpha$ -トコフェロール	$64.9 \pm 3.0$	$62.8 \pm 4.5$
トリプトファン	$15.7 \pm 1.8$	$0.5 \pm 2.1$

10% w/v マウス赤血球懸濁液に 0.6%  $H_2O_2$  を添加し 37°C で 2 時間インキュベートした後、脂質過酸化は TBA 法で溶血はシアノメトヘモグロビン法で測定した。  
 Means  $\pm$  S.E. (n=4)

#### 2.6.2.3. 脂質過酸化および溶血に対するクルクミノイドの抑制作用

生薬としてまた香辛料として用いられる鬱金(Turmeric)に含まれるクルクミン、4-Hydroxycinnamoyl(feruloyl)methane、bis-(4-Hydroxycinnamoyl)methane(Fig.4)は、種々の反応系において抗酸化作用が認められている<sup>39, 40)</sup>。そこで、コーヒー酸と同様に  $H_2O_2$  による赤血球の脂質過酸化および溶血に対する作用の検討を行った。

クルクミン、4-Hydroxycinnamoyl(feruloyl)methane、bis-(4-Hydroxycinnamoyl)methane の  $H_2O_2$  によって引き起こされる赤血球の脂質過酸化に対する作用を検討すると、クルクミン、4-Hydroxycinnamoyl(feruloyl)methane、bis-(4-Hydroxycinnamoyl)methane すべてが 2 ~ 50  $\mu M$  の範囲で濃度依存的に脂質過酸化を強く抑制した(Fig. 14)。



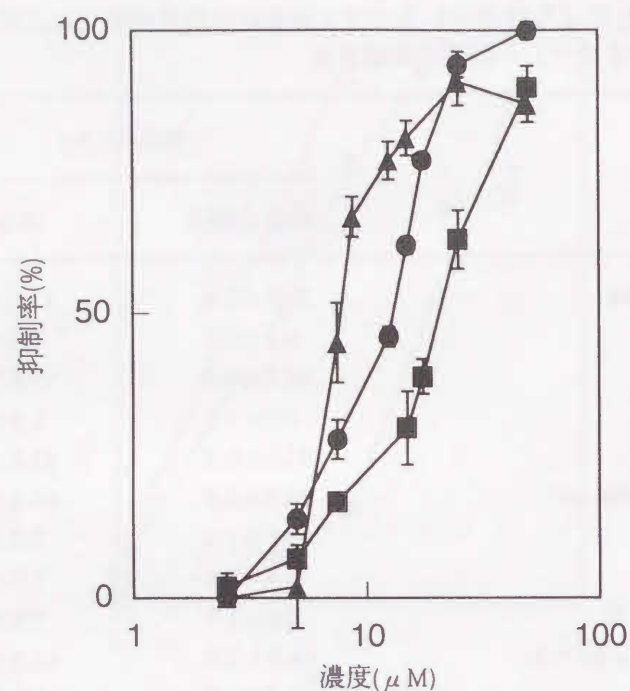


Fig. 14  $H_2O_2$  によって誘導されるマウス赤血球の脂質過酸化反応に対するクルクミノイドの抑制作用.  
 $H_2O_2$  濃度: 0.6 %  
 反応時間: 2 h (37°C)  
 Means  $\pm$  S.E. (n=4)  
 ● クルクミン  
 ▲ 4-Hydroxycinnamoyl(feruloyl)methane  
 ■ bis-(4-Hydroxycinnamoyl)methane

クルクミノイドの赤血球の脂質過酸化に対する抑制作用の強さを比較すると、4-Hydroxycinnamoyl(feruloyl)methane > クルクミン > bis-(4-Hydroxycinnamoyl)methane の順であった。この結果は、リノール酸空気酸化の TBAV におけるの抗酸化能(クルクミン 100%、4-Hydroxycinnamoyl(feruloyl)methane 94%、bis-(4-Hydroxycinnamoyl)methane 80%)<sup>39)</sup> とほぼ一致していた。

溶血に対する作用を検討すると、クルクミンは 2 ~ 17.5  $\mu$ M の範囲で濃度依存的に溶血を強力に抑制した。17.5  $\mu$ M の濃度では、73.7  $\pm$  6.2% の抑制効果を示したが、そ

れ以上の高濃度では、逆に抑制効果は低下した。脂質過酸化とは異なり、4-Hydroxycinnamoyl(feruloyl)methane、bis-(4-Hydroxycinnamoyl)methane には溶血の抑制作用は認められなかった。50  $\mu$ M の濃度においても 4-Hydroxycinnamoyl(feruloyl)methane、bis-(4-Hydroxycinnamoyl)methane は、13.1  $\pm$  1.1%、22.3  $\pm$  4.6% の抑制効果しか示さなかった(Fig. 15)。

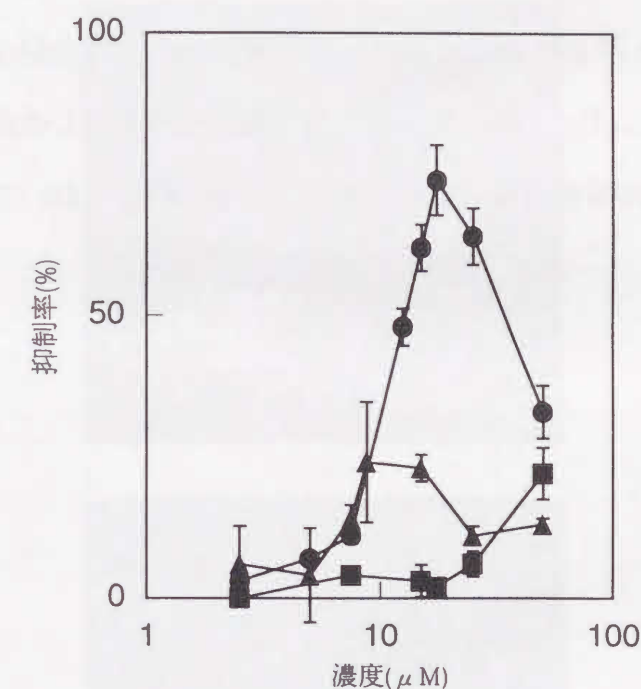


Fig. 15  $H_2O_2$  によって誘導されるマウス赤血球の溶血に対するクルクミノイドの抑制作用.  
 $H_2O_2$  濃度: 0.6 %  
 反応時間: 2 h (37°C)  
 Means  $\pm$  S.E. (n=4)  
 ● クルクミン  
 ▲ 4-Hydroxycinnamoyl(feruloyl)methane  
 ■ bis-(4-Hydroxycinnamoyl)methane

#### 2.6.2.4. 溶血抑制効果の電子顕微鏡による観察

2.6.2.2.に示したように  $\text{H}_2\text{O}_2$  によって引き起こされる赤血球の溶血現象を  
コーヒー酸などが抑制することを認めたので、赤血球の形態学的な変化に対する  
作用を観察するため、走査型電子顕微鏡で形態学的観察を行った。正常赤血球は  
中央がくぼみ表面が平滑な像(Fig.16 a)を示すが、 $\text{H}_2\text{O}_2$  を添加すると赤血球は正  
常な像とは異なり、表面の平滑さが失われ有棘化を起こしていることが確認され  
た(Fig.16 b)。すなわち、 $\text{H}_2\text{O}_2$  によって赤血球は有棘化をおこし溶血することを  
認めた。コーヒー酸を  $25\text{ }\mu\text{M}$  添加すると、赤血球は平滑で中央がくぼんだ正常  
赤血球に似た像を示し、 $\text{H}_2\text{O}_2$  により起こる有棘化を抑制していた(Fig.16 c)。コ  
ーヒー酸による赤血球の溶血現象の抑制作用を形態学的観察においても確認した。

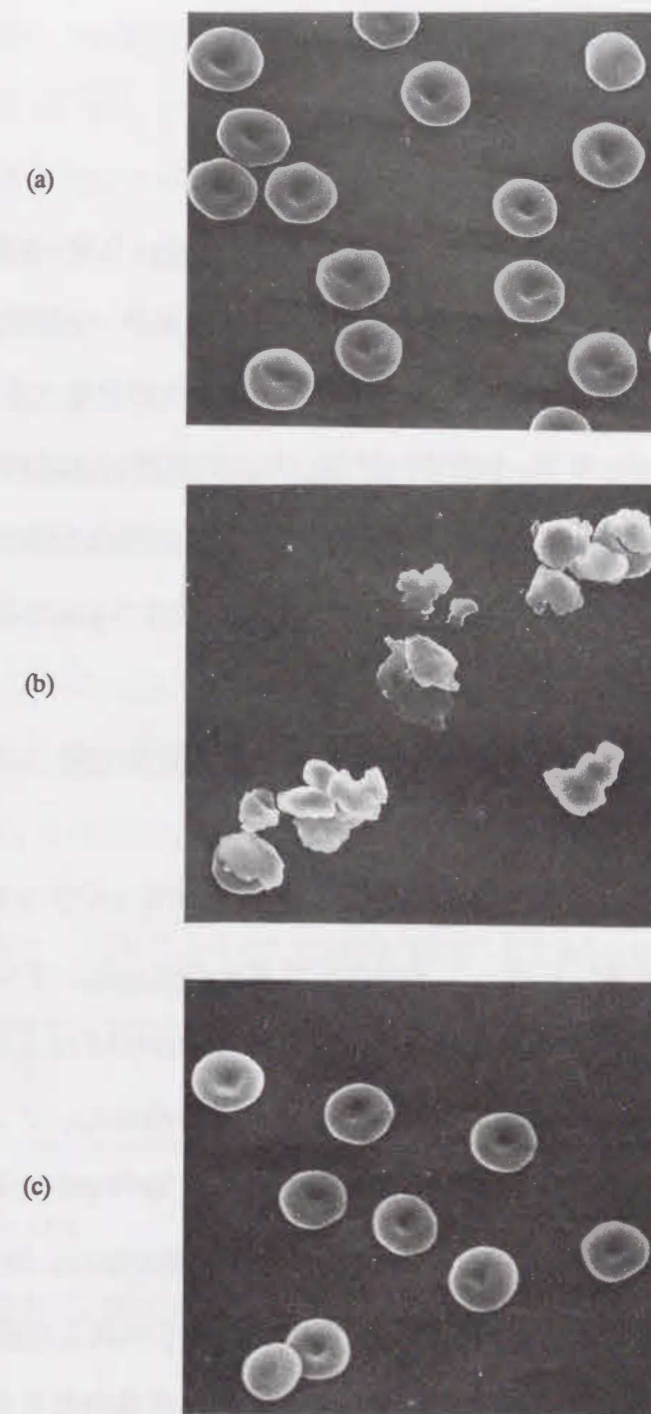


Fig.16 マウス赤血球の電子顕微鏡観察  $\times 1900$   
(a) : コントロール  
(b) :  $0.6\%$   $\text{H}_2\text{O}_2$  処理  
(c) :  $25\text{ }\mu\text{M}$  コーヒー酸 +  $0.6\%$   $\text{H}_2\text{O}_2$  処理



## 2. 7. CCl<sub>4</sub> による肝脂質過酸化に対する作用

### 2. 7. 1. 実験方法

#### 2. 7. 1. 1. 肝障害マウスの作成

CCl<sub>4</sub> 肝障害マウスは、オリーブ油と 1 : 1 に混じた CCl<sub>4</sub> 1 ml/kg B.W. を腹腔内投与することにより作成した。試料前処置群は各化合物 3 μmol/kg B.W. を腹腔内投与したのち、CCl<sub>4</sub> を 1 ml/kg B.W. 腹腔内投与した。非処置群には、生理食塩水を試料と同量腹腔内投与した後、CCl<sub>4</sub> 1 ml/kg B.W. を腹腔内投与した。対照群には試料を同量投与した後、さらにオリーブ油を CCl<sub>4</sub> と同容量腹腔内投与した。試料は生理食塩水またはオリーブ油に溶解した。投与量が 0.12 ml/10 g B.W. となるように試料濃度を調製した。

#### 2. 7. 1. 2. 肝の過酸化脂質量の測定

CCl<sub>4</sub> 投与 24 時間後に肝臓を摘出し、冷 1.15% KCl 溶液で 10% w/v 肝ホモジネート溶液を調製し、Ohkawaらの方法<sup>50)</sup>に従って過酸化脂質量を測定した。すなわち、肝ホモジネート溶液 0.2 ml に 8.1% SDS 0.2 ml、20% 酢酸緩衝液(pH3.5) 1.5 ml、0.8% TBA 溶液 1.5 ml を加え、95℃ で 1 時間加熱した。反応終了後冷却し、ブタノール : ピリジン(15 : 1)混液 5 ml、水 1 ml を加えよく攪拌したのち、3000 rpm で 15 分間遠心をした。上層(ブタノール層)をとり 535 nm における吸光度を測定した。過酸化物の標準品として 10 μM TEP を用い、上記と同様の操作を行い、以下の式より過酸化物の濃度を算出した。過酸化脂質量は、MDA 量に換算して肝の g 湿重量当たりの量で示した。

$$\text{過酸化物の濃度(nmol MDA/g 湿重量)} = \frac{\text{試料の吸光度}}{\text{TEP の吸光度}} \times 100$$

### 2. 7. 2. 結果

#### 2. 7. 2. 1. クロロゲン酸の抑制効果の投与時間による影響

CCl<sub>4</sub> は、肝ミクロゾームの P-450 で代謝され生じた •CCl<sub>3</sub> が膜の脂質過酸化反応の連鎖反応を開始させ、過酸化脂質量の増加を起こすと言われ<sup>51)~53)</sup>、CCl<sub>4</sub> による毒性は *all-rac-α*-トコフェロールや BHT などの抗酸化物質により軽減されることが認められている<sup>54)</sup>。そこで、生体内における作用の検討をするために CCl<sub>4</sub> により誘導される肝の脂質過酸化反応の系を実験に組み入れた。

まず、クロロゲン酸の脂質過酸化抑制作用の投与時間による影響を検討した。CCl<sub>4</sub> を腹腔内投与すると、肝の過酸化脂質量は 24 時間後に約 5 倍に増加した。次に、CCl<sub>4</sub> 処理直前、30 分前、1 時間前に 3 μmol/kg B.W. クロロゲン酸を腹腔内投与すると、肝の過酸化脂質増加はそれぞれ 79.0 ± 3.6%、73.3 ± 1.2%、50.7 ± 6.4% 抑制された。3 時間前、6 時間前の投与では、抑制効果はほとんど認められなかった(Table 6)。

Table 6 CCl<sub>4</sub> によるマウス肝脂質過酸化に対するクロロゲン酸の作用と投与時間の関係

群	投与時間 <sup>a)</sup> (h)	過酸化脂質量 <sup>b)</sup> (nmol/g湿重量)	抑制率 (%)
CCl <sub>4</sub> 非投与群		482 ± 24.1	
CCl <sub>4</sub> 投与			
クロロゲン酸非投与群		1717 ± 94.5	
クロロゲン酸投与群			
	-6	1720 ± 96.2	0.7 ± 8.3
	-3	1598 ± 57.4	10.3 ± 4.7
	-1	1084 ± 85.0	50.7 ± 6.4
	-0.5	807 ± 11.0	73.3 ± 1.2
	0	739 ± 45.4	79.0 ± 3.6

a) CCl<sub>4</sub> 投与(1 ml/kg B.W.)の 6 時間前(-6 h)、3 時間前(-3 h)、1 時間前(-1 h)、30 分前(-0.5 h)、直前(0 h)に、それぞれクロロゲン酸(3 μmol/kg B.W.)をマウスの腹腔内に投与し、CCl<sub>4</sub> 投与 24 時間後の肝の過酸化脂質量を TBA 法で測定した。

b) 肝の過酸化脂質量を MDA 量に換算して表示している。

Means ± S.E.(n=4)



#### 2.7.2.2. 肝脂質過酸化に対するコーヒー酸類の抑制作用

コーヒー酸に関する消化吸収や代謝、血中への移行に関しては、種々の報告がある。クロロゲン酸は投与されるとコーヒー酸とキナ酸に分解され、そしてコーヒー酸はメチル化、脱水酸化によりフェルラ酸、*m*-クマル酸、さらにバニリン酸に代謝され Fig. 17 に示したような種々の代謝産物となり、経口投与 0～8 時間後に、また最終代謝産物である *m*-HHA となって投与 8～24 時間後に尿中に排出されることが確認されている<sup>55, 56)</sup>。この点において、摂取された後の消化吸収や代謝、血中への移行に関する報告が少ないフラボノイドとは異なる<sup>57)</sup>。上記の実験において、CCl<sub>4</sub> 処理 6 時間前および 3 時間前にクロロゲン酸を腹腔内投与すると、CCl<sub>4</sub> 処理時にはほとんどフェルラ酸、バニリン酸などの代謝産物となっていることが推測される。そこで、初期の代謝産物であるフェルラ酸、バニリン酸などの関連化合物の CCl<sub>4</sub> によるマウス肝脂質過酸化の抑制作用について検討を行った。

CCl<sub>4</sub> 投与直前に各化合物 3 μmol/kg B.W. を腹腔内投与し、CCl<sub>4</sub> 投与 24 時間後における肝の脂質過酸化量を測定すると、クロロゲン酸、*p*-クマル酸、プロトカテキュ酸、*all-rac-α*-トコフェロールは、過酸化脂質増加を抑制したが、コーヒー酸、桂皮酸、フェルラ酸、バニリン酸、アスコルビン酸は CCl<sub>4</sub> 投与による肝の過酸化脂質増加をほとんど抑制しなかった (Table 7)。

フェルラ酸、バニリン酸に抑制効果は認められなかったことから、CCl<sub>4</sub> 処理 6 時間前にクロロゲン酸を投与しても抑制効果が認められず、クロロゲン酸投与時間が CCl<sub>4</sub> 処理前 1 時間以内でなければ強力な効果が得られないことは納得できる。

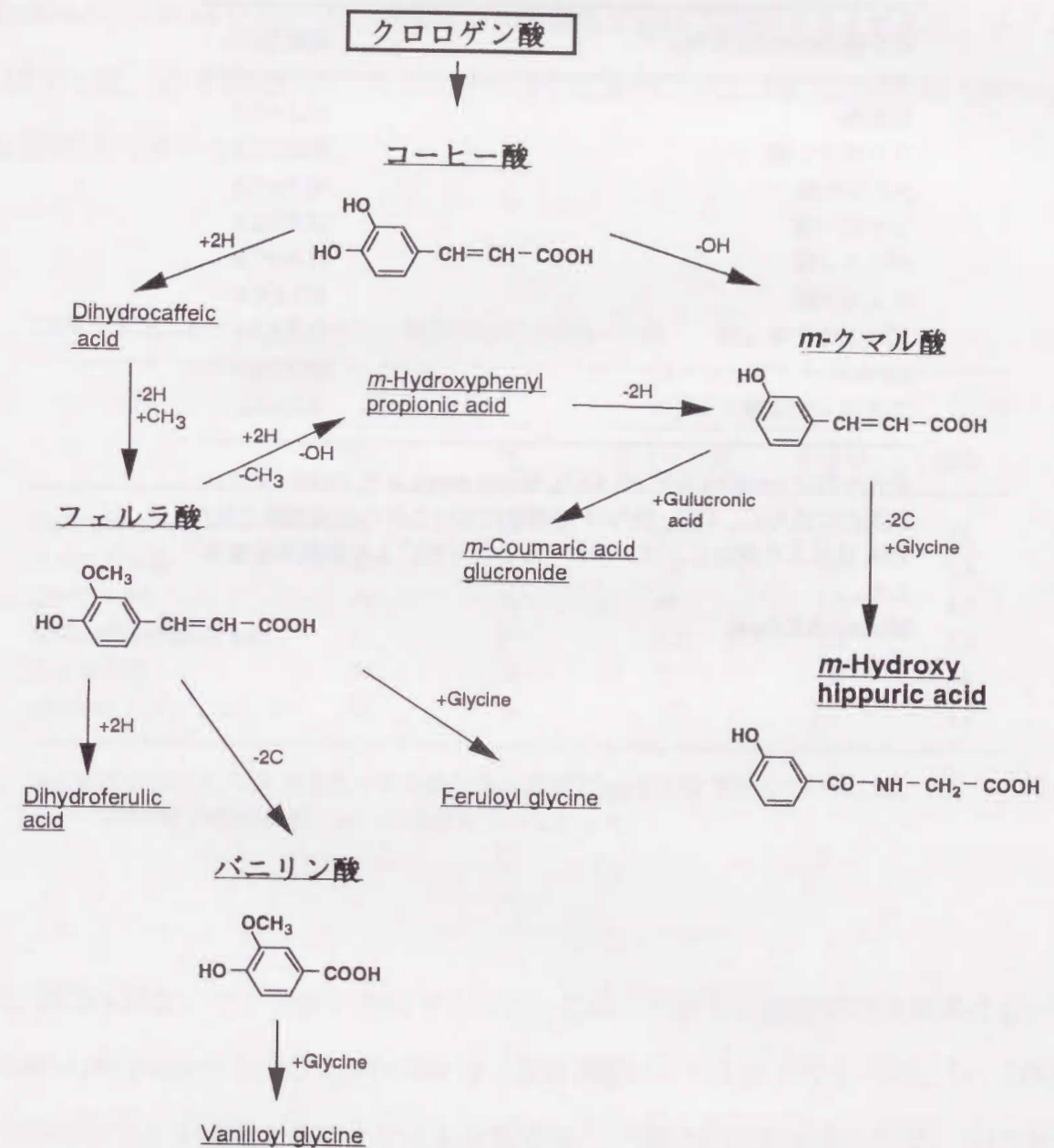


Fig. 17 コーヒー酸類の代謝



Table 7 CCl<sub>4</sub> により誘導されるマウス肝脂質過酸化反応に対する  
 コーヒー酸類の抑制効果

化合物(3μmol/kg B.W.)	抑制率(%)
桂皮酸	15.2±7.5
クロロゲン酸	79.0±3.6
p-クマル酸	40.7±7.3
コーヒー酸	15.9±2.6
バニリン酸	21.0±7.9
フェルラ酸	0.3±9.4
プロトカテキュ酸	51.5±7.2
all-rac-α-トコフェロール	85.1±6.9
アスコルビン酸	6.2±4.1

各化合物(3 μmol/kg B.W.)を CCl<sub>4</sub> 投与(1 ml/kg B.W.)直前にマウス  
 腹腔内に投与し、CCl<sub>4</sub> 投与24 時間後における肝の脂質過酸化量を  
 TBA 法により測定し、コントロールとの比較により抑制率を算出  
 した。

Means±S.E.(n=4)

## 2. 8. 考察

Caffeoyltryptophan において、今回行った実験系における活性をまとめると、ラジカ  
 ル捕捉作用、O<sub>2</sub><sup>-</sup> 不活化作用、さらに赤血球脂質過酸化および溶血抑制作用の活性は  
 ほぼ同程度であった(Table 8)。

Table 8 各反応系におけるコーヒー酸類の抗酸化活性の比較

	不活化反応		脂質過酸化反応		
	DPPH・	O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	リノール酸	赤血球	溶血
Caffeoyltryptophan	20	22	6.1	22	21
クロロゲン酸	17	21	15	3.1	3.0
コーヒー酸	14	24	18	3.5	4.8
3,5-Dicaffeoylquinic acid	11	8.1	2.2	7.1	5.0
フェルラ酸	50	*	25	*	*
all-rac-α-トコフェロール	24	*	1.7	2.2	1.2

各反応系において 50% 効果を示す各化合物の濃度(IC<sub>50</sub>)を μM で示している。

\*1 ~ 100 μM の濃度範囲において作用を示さなかった。

3,5-DCQA においても同様の傾向であった。このことから、赤血球の実験系におい  
 て Caffeoyltryptophan および 3,5-DCQA は、脂質過酸化の引き金となる・OH、L・、LOO・  
 などのラジカルを捕捉することにより脂質過酸化の開始反応(Fig.18の式②、③)や連  
 鎖反応(Fig.18の式④、⑤)を抑制していると考えられる。

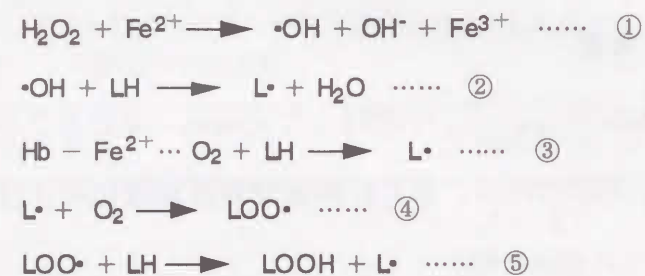


Fig. 18  $\text{H}_2\text{O}_2$  による赤血球膜の過酸化の誘導機序  
 ヒポキサンチン-XOD系で考えられている誘導  
 機序<sup>58~60)</sup>に基づく。  
 $\text{H}_2\text{O}_2$  が溶液中の鉄及び Hb と反応し  $\cdot\text{OH}$  を発生  
 あるいは  $\text{Hb} - \text{Fe}^{2+} \cdots \text{O}_2$  となり膜の脂質過酸化の  
 引き金(式②③)となると考えられる。

トリプトファンには、今回行った実験系すべてにおいて、つまり DPPH ラジカル捕捉作用、 $\text{O}_2^-$  不活性作用、リノール酸ミセル脂質過酸化抑制作用、赤血球の脂質過酸化および溶血の抑制作用は認められなかった。また、コーヒー酸が2個結合した3,5-DCQA が実験に用いた化合物の中で最も多くのラジカルを捕捉し強力な抗酸化作用を示したこと、クロロゲン酸とコーヒー酸がほぼ同数のラジカルを捕捉し、抗酸化作用を示したことから、Caffeoyltryptophan やクロロゲン酸さらに3,5-DCQA の示す活性はカテコールの部位に基づいていることが推測される。

コーヒー酸やクロロゲン酸は、ラジカル捕捉作用、 $\text{O}_2^-$  不活性化、リノール酸の脂質過酸化の抑制は、同程度であった(Table 8)。 $\text{H}_2\text{O}_2$  による赤血球の脂質過酸化抑制作用は、他の系の作用よりも強力で、また *all-rac*- $\alpha$ -トコフェロールよりも強力であったことは非常に興味深い。Laranjinha らは、コーヒー酸やクロロゲン酸が、 $\text{H}_2\text{O}_2$  によるミオグロビンや LDL の酸化を抑制し、Trolox(*all-rac*- $\alpha$ -トコフェロールの水溶性物質)より強力であることを示している。またこの強力な作用は $\text{H}_2\text{O}_2$  により酸化されたフェリールミオグロビンをコーヒー酸やクロロゲン酸が Trolox よりもすばやく還元するた

めであると報告した<sup>61, 62)</sup>。このことから、今回の実験でのコーヒー酸やクロロゲン酸の強力な赤血球の脂質過酸化の抑制作用は、コーヒー酸やクロロゲン酸のヘモグロビンに対する強力な還元作用によるのではないかと考えられる。

一方、クルクミン、4-hydroxycinnamoyl(feruloyl)methane、bis-(4-hydroxycinnamoyl)methane はそれぞれ、メチル基を介してフェルラ酸が2個、メチル基を介して桂皮酸とフェルラ酸が、またメチル基を介して *p*-クマル酸が2個結合した化合物であるが(Fig. 3)、その構成成分であるフェルラ酸、桂皮酸、*p*-クマル酸には、赤血球の脂質過酸化および溶血に対して抑制作用が認められなかった(Table 5)。クルクミンの抗酸化作用を示す機構は、 $\beta$ -ジケトン部で金属錯体を形成し過酸化反応の場から金属イオンを消去することであると報告されている<sup>63, 64)</sup>。さらに、クルクミンの代謝産物の一つである Tetrahydrocurcumin がクルクミン以上の強力な脂質過酸化抑制作用を示すことから、*in vivo* における活性の発現には、クルクミンと Tetrahydrocurcumin に共通である  $\beta$ -ジケトン部の構造の必要性が示されている<sup>65)</sup>。

クルクミンの経口投与が  $\text{CCl}_4$  により引き起こされる肺、肝、腎、脳の脂質過酸化を抑制するが<sup>66)</sup>、今回の実験においてフェルラ酸は  $\text{CCl}_4$  により引き起こされる肝の脂質過酸化を抑制しなかった。

以上のことから、クルクミノイドとフェルラ酸類では脂質過酸化抑制を示す活性部位や機構が異なると考えられる。この点で、クロロゲン酸等とは異なっている。

溶血現象は脂質過酸化における赤血球の膜の形態異常化によるとされ、HX-XOD 系では、脂質過酸化反応の過程で生じた MDA が膜タンパクへ作用し、構造および流動性に影響を与え、そのため赤血球が本来の形態を維持できず有棘化がおこり、そして溶血を起こすことが観察されている<sup>58)~60)</sup>。今回の実験においても、溶血現象は脂質過酸化に遅れて起こることが、さらに電子顕微鏡による観察においても、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の添加により赤血球の有棘化が起こることが確認された。このことから、溶血



現象は膜の脂質過酸化により引き起こされることが明らかになった。またコーヒー酸による有棘化の阻害が明らかになったことより、クロロゲン酸、3,5-DCQA、さらに Caffeoyltryptophan は赤血球膜の脂質過酸化を抑制することにより赤血球の有棘化を阻害し溶血を抑制していることが示唆された。

$H_2O_2$  によって起こる溶血現象は赤血球膜の脂質過酸化に起因していると考えられる。しかし、4-Hydroxycinnamoyl(feruloyl)methane、bis-(4-Hydroxycinnamoyl)methane は脂質過酸化を抑制したが、溶血を抑制しなかった。このことは、4-Hydroxycinnamoyl(feruloyl)methane や bis-(4-Hydroxycinnamoyl)methane 自体が脂質過酸化には無関係に赤血球の溶血現象を引き起こしているためなのか、また 4-Hydroxycinnamoyl(feruloyl)methane や bis-(4-Hydroxycinnamoyl)methane の脂質過酸化抑制反応の際に生ずる中間物質が溶血現象を引き起こしているためではないかと考えられる。また、クルクミンが  $17.5 \mu M$  以上の高濃度では脂質過酸化を抑制するが、溶血現象は抑制しないという結果も、クルクミン自体が高濃度になると脂質過酸化には無関係に溶血現象を引き起こすのか、または脂質過酸化抑制反応の際に生ずる中間物質が溶血現象を引き起こすためではないかと考える。

### 第3章 漢方方剤および生薬の活性酸素に対する作用

#### 3. 1. 序論

桃核承気湯は代表的な駆瘀血剤で、瘀血症に伴う諸症状に対して臨床的によく用いられているが、長期経口投与により血清脂質および血漿過酸化脂質の減少が報告されている<sup>67)</sup>。さらに、大柴胡湯には経口投与により  $CCl_4$  肝障害ラットの脂質過酸化の抑制が、十全大補湯には放射線障害の防護作用が認められている<sup>68、69)</sup>。このように抗酸化作用を示す方剤とその関連方剤について、ラジカルおよび  $O_2^-$  との反応性について検討を行った。

また、糖尿病は活性酸素やフリーラジカルのみが発症の原因ではないが、その発症に伴って出現する種々の合併症や増悪因子の一つとして活性酸素やフリーラジカルが考えられてきている<sup>70)~72)</sup>。そこで、糖尿病治療薬として用いられている八味地黄丸、白虎加人参湯について、ラジカルおよび  $O_2^-$  との反応性についての検討を行った。

加えて、リノール酸空気酸化抑制効果が報告されている<sup>73)</sup>芳香性生薬の丁字、桂皮、茴香、橙皮、莪朮のラジカルおよび  $O_2^-$  との反応性についての検討も行った。

さらに、桂枝茯苓丸は赤血球変形能改善作用<sup>74)</sup>、微小循環改善作用<sup>75)</sup>を示すことが、また桃核承気湯は血液粘度低下作用や血清脂質、GSH 代謝にも影響を及ぼすことが確認されている<sup>76、77)</sup>。毛細血管床における微小循環障害である瘀血症は、血液粘度上昇によると考えられ<sup>78)</sup>、その血液粘度決定因子である赤血球変形能は、赤血球膜の脂質過酸化反応により生じる MDA により低下すると言われている<sup>79)</sup>。このように、瘀血症が特に赤血球の脂質過酸化と深く関わっていると思われる。そこで、 $H_2O_2$  によって誘導される赤血球の脂質過酸化と溶血に対する桂枝茯苓丸、桃核承気湯、当帰芍薬散の作用を検討した。



### 3. 2. 実験材料

#### 3.2.1. 漢方方剤エキス、生薬エキスの調製

漢方方剤エキス、生薬エキスの調製は、日本薬局方に準じた市場品(高砂薬業)の生薬を用い、Table 9に示した割合で煎じ、熱抽出から自家製の凍結乾燥エキスを作製し、各試験法に用いた。

生薬エキスは、各生薬 5 g を 500 ml の蒸留水で半量になるまで煎じ、その煎液を凍結乾燥し作製した。

Table 9 漢方方剤とその構成生薬

漢方方剤	構成生薬名
桂枝茯苓丸	桂皮 3 g、茯苓 3 g、牡丹皮 3 g、芍薬 3 g、桃仁 3 g
桃核承気湯	桂皮 4 g、甘草 1.5 g、芒硝 0.9 g、桃仁 5 g、大黄 3 g
当帰芍薬散	沢瀉 4 g、当帰 3 g、白朮 4 g、川芎 3 g、芍薬 4 g
八味地黄丸	地黄 6 g、山茱萸 3 g、山薬 3 g、沢瀉 3 g、茯苓 3 g、牡丹皮 2.5 g、桂皮 1 g、附子 0.5 g、
白虎加人参湯	石膏 15 g、知母 5 g、甘草 2 g、芍薬 3 g、桃仁 3 g
大柴胡湯	柴胡 6 g、半夏 4 g、黄芩 3 g、芍薬 3 g、大棗 3 g、枳実 2 g、生姜 1 g、大黄 1 g
小柴胡湯	柴胡 7 g、半夏 5 g、黄芩 3 g、大棗 3 g、人参 3 g、甘草 2 g、生姜 1 g
柴朴湯	柴胡 7 g、半夏 5 g、茯苓 5 g、黄芩 3 g、厚朴 3 g、大棗 3 g、人参 3 g、甘草 2 g、蘇葉 2 g、生姜 1 g
人参養栄湯	地黄 4 g、当帰 4 g、白朮 4 g、茯苓 4 g、人参 3 g、桂皮 2.5 g、遠志 2 g、芍薬 2 g、陳皮 2 g、黄耆 1.3 g、甘草 1 g、五味子 1 g
補中益気湯	黄耆 4 g、蒼朮 4 g、人参 4 g、当帰 3 g、柴胡 2 g、大棗 2 g、陳皮 2 g、甘草 1.5 g、升麻 1 g、生姜 0.5 g
十全大補湯	黄耆 3 g、桂皮 3 g、地黄 3 g、芍薬 3 g、川芎 3 g、蒼朮 3 g、当帰 3 g、人参 3 g、茯苓 3 g、甘草 1.5 g
麦門冬湯	麦門冬 10 g、半夏 5 g、大棗 3 g、甘草 2 g、粳米 2 g

### 3. 3. DPPHラジカルの不活性化

#### 3.3.1. 実験方法

第2章に記載した方法により実験を行った。

#### 3.2.2. 結果

駆瘀血剤の桂枝茯苓丸、桃核承気湯は 1 ~ 100  $\mu\text{g/ml}$  の範囲で濃度依存的 DPPH ラジカルを捕捉した。しかし、同じ駆瘀血剤である当帰芍薬散には 1 ~ 100  $\mu\text{g/ml}$  の濃度範囲ではラジカル捕捉活性はほとんど認められなかった(Fig. 19)。

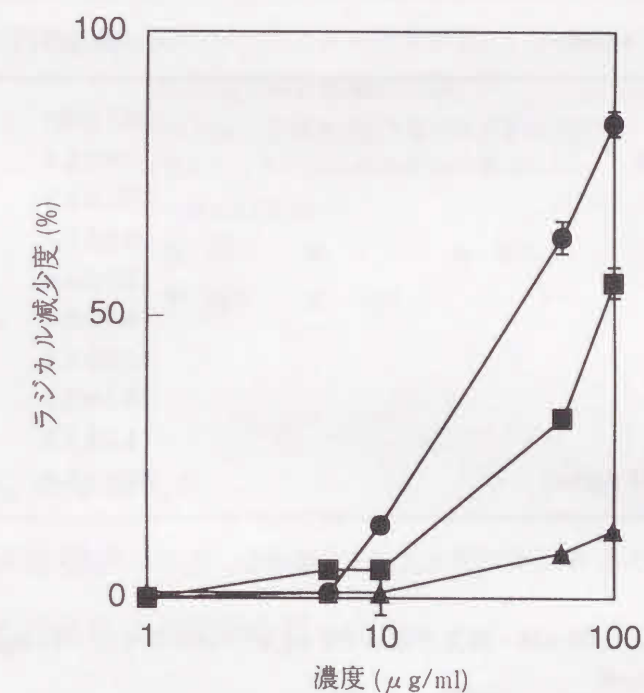


Fig. 19 DPPH ラジカルの特異吸収(517nm)に対する駆瘀血剤の作用。

517nm における 20 分間の吸光度減少を測定し、ラジカル減少度(%)を算出した。

Means  $\pm$  S.E. (n=4)

- 桂枝茯苓丸
- 桃核承気湯
- ▲ 当帰芍薬散



最終濃度 100  $\mu\text{g/ml}$  の添加において桂枝茯苓丸は  $56.0 \pm 2.7\%$ 、桃核承気湯は  $83.5 \pm 3.2\%$  のラジカル減少度を示した。当帰芍薬散は、最終濃度 100  $\mu\text{g/ml}$  においても  $11.6 \pm 0.2\%$  のラジカル減少度しか示さなかった。最終濃度 100  $\mu\text{g/ml}$  の添加における各方剤の DPPH ラジカル捕捉活性を Table 10 に示した。八味地黄丸、十全大補湯に弱いラジカル捕捉活性が認められた。また、白虎加人参湯、小柴胡湯、麦門冬湯にはまったく DPPH ラジカルの捕捉作活性は認められなかった。

Table 10 DPPHラジカルの特異吸収(517 nm)に対する漢方方剤の作用

漢方方剤(100 $\mu\text{g/ml}$ )	ラジカル減少度(%)
八味地黄丸	$17.1 \pm 0.5$
白虎加人参湯	$2.6 \pm 0.4$
大柴胡湯	$7.0 \pm 1.2$
小柴胡湯	$0.0 \pm 0.4$
柴朴湯	$12.0 \pm 1.4$
人参養栄湯	$8.7 \pm 0.7$
補中益気湯	$11.5 \pm 1.2$
十全大補湯	$23.3 \pm 2.5$
麦門冬湯	$1.2 \pm 1.3$
システイン(12 $\mu\text{g/ml}$ )	$82.2 \pm 1.8$

517 nm における 20 分間の吸光度減少を測定し、ラジカル減少度(%)を算出した。  
DPPHラジカル: 86  $\mu\text{M}$  漢方方剤: 100  $\mu\text{g/ml}$  システイン: 12  $\mu\text{g/ml}$   
Means  $\pm$  S.E.(n=4)

生薬について検討すると、0.01 ~ 1 mg/ml の範囲で丁字、桂皮に濃度依存的にラジカル捕捉活性が認められた。茴香、橙皮、莪朮は、最終濃度 1 mg/ml の添加において弱いラジカル捕捉活性を認めた(Fig. 20)。

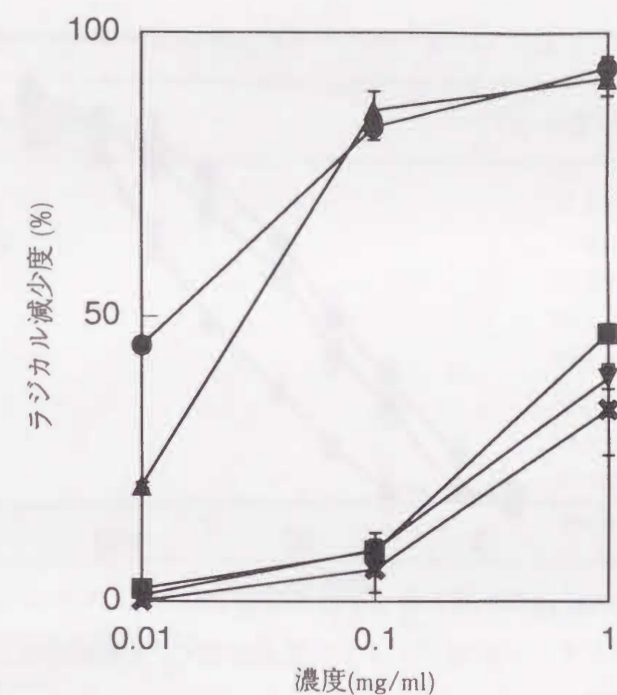


Fig. 20 DPPH ラジカルの特異吸収(517nm)に対する芳香性生薬の作用。

517nm における 20 分間の吸光度減少を測定し、ラジカル減少度(%)を算出した。

Means  $\pm$  S.E. (n=4)

■ 茴香 ● 丁子 ▲ 桂枝  
▼ 橙皮 × 莪朮

### 3. 4. $\text{O}_2^-$ の不活性化

#### 3. 4. 1. 実験方法

第2章に記載した方法により実験を行った。

#### 3. 4. 2. 結果

駆瘀血剤に関して  $\text{O}_2^-$  との反応性を 1 ~ 300  $\mu\text{g/ml}$  の範囲で検討すると、3 剤すべてに濃度依存的な  $\text{O}_2^-$  の不活化活性を認めた。中でも、桃核承気湯が最も強い不活性化活性を示した(Fig. 21)。

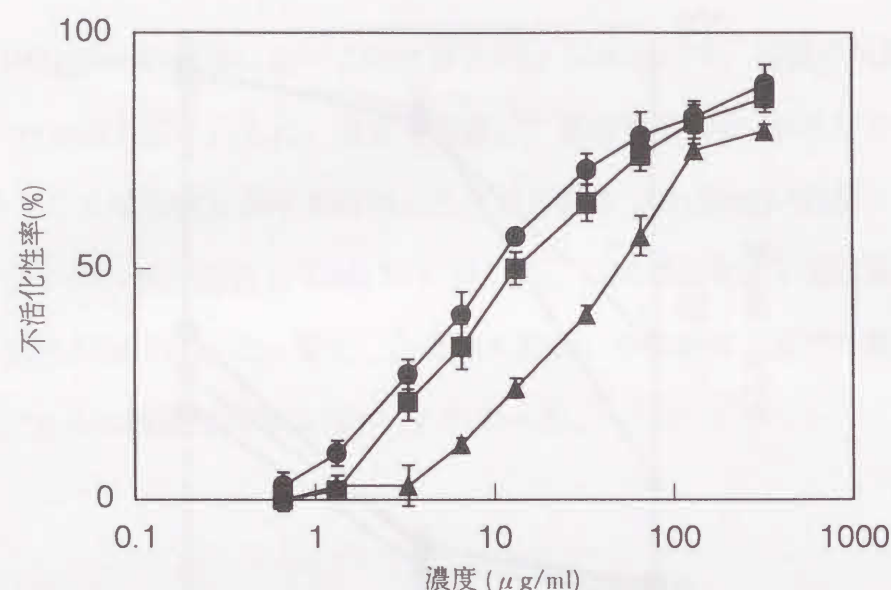


Fig. 21 キサンチン-XOD 系において生成する  $O_2^-$  と駆瘀血剤との反応性。  
20 分間のジホルマザンの生成を指標として  $O_2^-$  不活化率を算出した。  
Means  $\pm$  S.E. (n=4)  
■ 桂枝茯苓丸 ● 桃核承氣湯 ▲ 当歸芍藥散

最終濃度 100  $\mu\text{g/ml}$  において  $O_2^-$  との反応性を検討すると、Table 11 に示したように八味地黄丸、柴胡湯、柴朴湯、十全大補湯、小柴胡湯、補中益気湯、人参養栄湯に  $O_2^-$  の不活性化活性を認めた。しかし、白虎加人参湯、麦門冬湯には  $O_2^-$  の不活性化活性を認めなかった。

生薬に関して  $O_2^-$  との反応性を 0.01 ~ 1 mg/ml の濃度範囲で検討すると、丁字、桂皮、茴香に濃度依存的に  $O_2^-$  の不活性化活性が認められた。しかし、莪朮、橙皮にはほとんど  $O_2^-$  との反応性は認められなかった(Fig. 22)。橙皮、莪朮は最終濃度 1 mg/ml の添加においても  $10.2 \pm 1.6\%$ 、 $3.9 \pm 0.6\%$  の  $O_2^-$  の不活性化活性しか示さなかった。

Table 11 キサンチン-XOD 系において生成する  $O_2^-$  と漢方方剤の反応性

漢方方剤(100 $\mu\text{g/ml}$ )	$O_2^-$ 不活性化率(%)
八味地黄丸	$54.3 \pm 5.6$
白虎加人参湯	$7.4 \pm 3.6$
大柴胡湯	$73.3 \pm 0.6$
小柴胡湯	$36.9 \pm 4.7$
柴朴湯	$71.1 \pm 5.5$
人参養栄湯	$31.5 \pm 1.0$
補中益気湯	$33.3 \pm 1.4$
十全大補湯	$57.0 \pm 2.7$
麦門冬湯	$9.0 \pm 2.2$

20 分間のジホルマザンの生成を指標として、各方剤 100  $\mu\text{g/ml}$  における  $O_2^-$  の不活性化率を算出した。  
Means  $\pm$  S.E. (n=4)

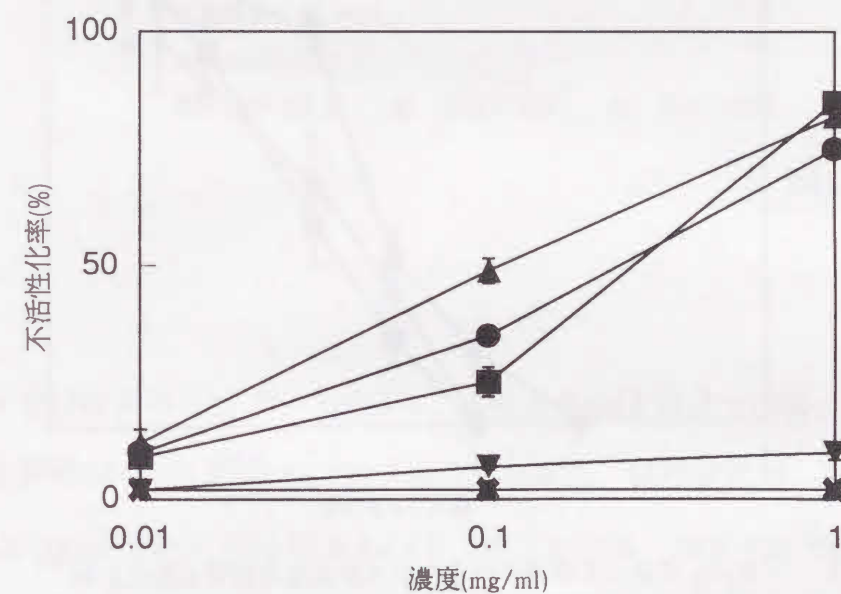


Fig. 22 キサンチン-XOD 系において生成する  $O_2^-$  と芳香性生薬との反応性。  
20 分間のジホルマザンの生成を指標として  $O_2^-$  不活化率を算出した。  
Means  $\pm$  S.E. (n=4)  
■ 茴香 ● 丁子 ▲ 桂枝 ▼ 橙皮 × 莪朮



### 3. 5. $H_2O_2$ による赤血球の脂質過酸化および溶血に対する抑制作用

#### 3. 5. 1. 実験方法

第2章に記載した方法により実験を行った。

#### 3. 5. 2. 結果

桂枝茯苓丸、桃核承気湯、当帰芍薬散すべてにおいて、赤血球の脂質過酸化と溶血の抑制作用が認められた(Fig. 23、24)。

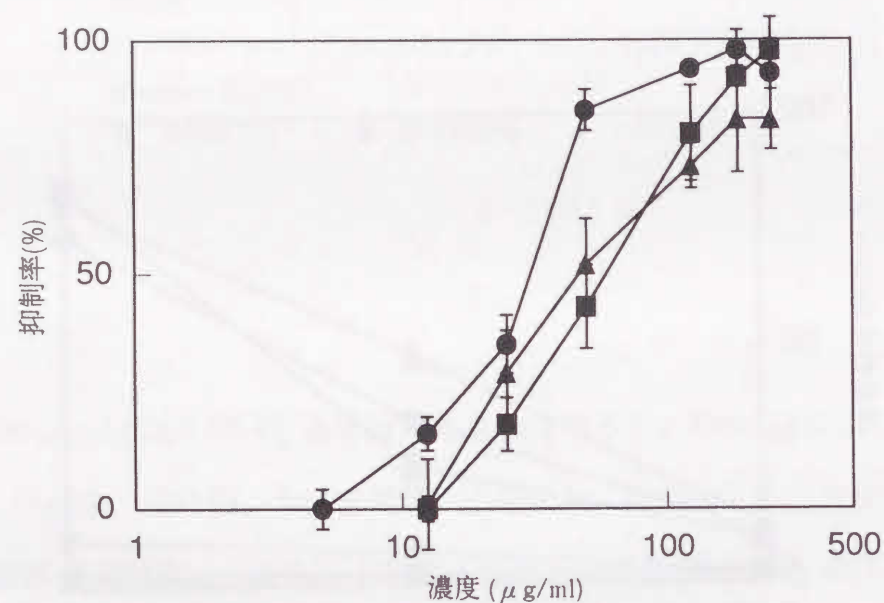


Fig. 23  $H_2O_2$  によって誘導されるマウス赤血球の脂質過酸化に対する駆瘀血剤の抑制作用.  
 $H_2O_2$  濃度: 0.6 %  
 反応時間: 2 h (37°C)  
 Means  $\pm$  S.E. (n=4)  
 ■ 桂枝茯苓丸 ● 桃核承気湯 ▲ 当帰芍薬散

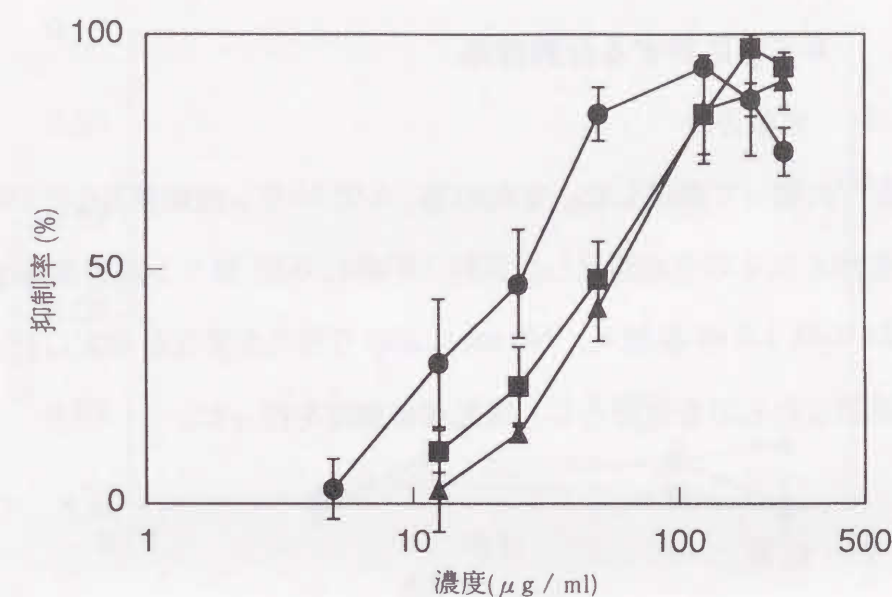


Fig. 24  $H_2O_2$  によって誘導されるマウス赤血球の溶血に対する駆瘀血剤の抑制作用.  
 $H_2O_2$  濃度: 0.6 %  
 反応時間: 2 h (37°C)  
 Means  $\pm$  S.E. (n=4)  
 ■ 桂枝茯苓丸 ● 桃核承気湯 ▲ 当帰芍薬散

125  $\mu$ g/ml で桂枝茯苓丸は  $79.6 \pm 10.3\%$ 、桃核承気湯は  $93.7 \pm 1.5\%$ 、当帰芍薬散は  $73.0 \pm 4.9\%$  の抑制を示し、溶血に対する桂枝茯苓丸、桃核承気湯、当帰芍薬散の抑制率は、125  $\mu$ g/ml でそれぞれ  $82.8 \pm 8.4\%$ 、 $93.3 \pm 1.2\%$ 、 $84.0 \pm 11.5\%$  であった。桂枝茯苓丸、桃核承気湯、当帰芍薬散すべてにおいて、脂質過酸化と溶血の抑制率はほぼ同程度であった(Fig. 23、24)。このことから、膜の脂質過酸化の抑制により溶血現象を抑制していることが示された。また、DPPH ラジカルおよび  $O_2^-$  のとの反応性と同様に、桃核承気湯が最も強い抑制作用を示した。

### 3. 6. $\text{H}_2\text{O}_2$ に対する分解作用

#### 3. 6. 1. 実験方法

Aebi の方法<sup>80)</sup>に従って測定した。すなわち、0.05 M リン酸緩衝液(pH 7.0) 1.0 ml に試料 2.0 ml を加えたものを対照とし、試料 2.0 ml に 0.05 M リン酸緩衝液(pH 7.0)で調製した 30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  1.0 ml を加え、240 nm における吸光度変化を測定した。試料の代わりに水を添加したものを対照とし、吸光度の測定を行った。

#### 3. 6. 2. 結果

桂枝茯苓丸、桃核承気湯、当帰芍薬散のすべての方剤において脂質過酸化および溶血の抑制作用が認められたが、この作用が  $\text{H}_2\text{O}_2$  の分解によるものでないかどうか、すなわち、カタラーゼのような作用を示していないかどうか検討した。桂枝茯苓丸、桃核承気湯、当帰芍薬散を 30 ~ 700  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度範囲で  $\text{H}_2\text{O}_2$  に反応させても、240 nm における吸光度に変化は生じなかった(Fig. 25)。すなわち、桂枝茯苓丸、桃核承気湯、当帰芍薬散は  $\text{H}_2\text{O}_2$  に対する分解作用のないことが示され、上記に示した駆瘀血剤の脂質過酸化および溶血の抑制作用は  $\text{H}_2\text{O}_2$  の分解作用によるものではないことが確認された。

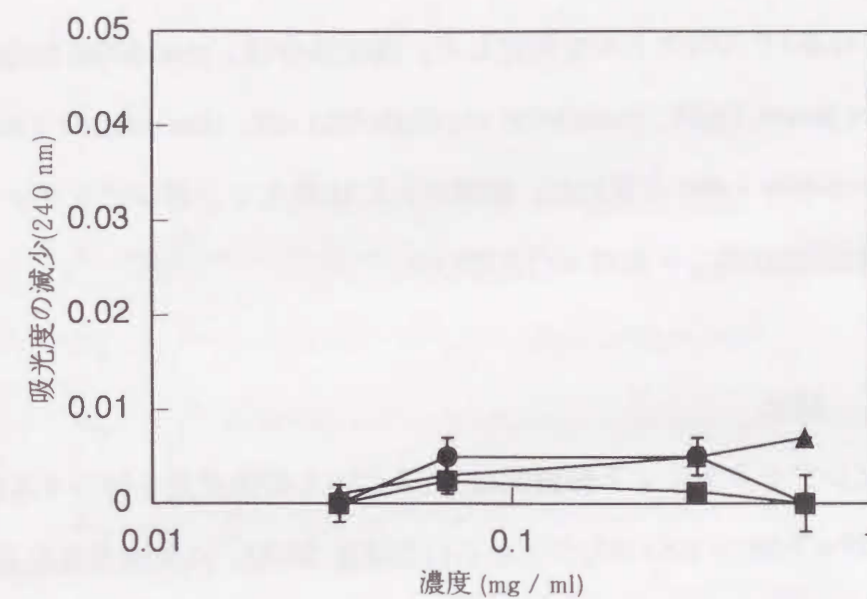


Fig. 25  $\text{H}_2\text{O}_2$  に由来する吸光度(240nm)に対する駆瘀血剤の影響。  
 $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度: 10 mM  
反応時間: 20 min (37℃)  
Means  $\pm$  S.E. (n=4)  
■ 桂枝茯苓丸 ● 桃核承気湯 ▲ 当帰芍薬散

### 3. 7. $\cdot\text{OH}$ に対する消去作用

#### 3. 7. 1. 実験方法

$\cdot\text{OH}$  に対する作用は electron spin resonance(ESR)による Iwahashi らのスピントラップ法<sup>81)</sup>により検討した。0.5 M 炭酸緩衝液(pH 7.4) 150  $\mu\text{l}$ 、0.5 mM 3-HAT 150  $\mu\text{l}$ 、1 M DMPO 30  $\mu\text{l}$ 、1 mM  $\text{FeCl}_3$  5  $\mu\text{l}$  に試料溶液 30  $\mu\text{l}$  加えた反応液に、0.1 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  10  $\mu\text{l}$  を加え反応を開始した。0.5 M 炭酸緩衝液は、使用直前に炭酸水素ナトリウム溶液に炭酸ガスを通気することにより、pH の調製を行った。3-HAT は、5.0 mM のリン酸緩衝液(pH 5.5)に溶解して用いた。20℃ で 10 分間インキュベートした後 FE2XG-ESR 分光計



(JOEL、東京、日本)でスペクトルを測定した。測定条件は、modulation frequency 100 kHz、microwave power 5 mW、modulation amplitude 0.1 mT、time constant 1 sec、scan range 10 mT、scan time 4 min と定めた。磁場修正には酸化マンガンのシグナルの中の3本目と4本目の間隔( $H_{3-4} = 8.69$  mT)を用いた。

### 3.7.2. 結果

•OH とのスピンアダクトによる特徴的な1:2:2:1の強度比を持つ4本線のESRシグナル( $a^N = a^H = 1.48 \sim 1.53$  mT)が認められた(Fig. 26 A)。八味地黄丸を最終濃度0.1 mg/ml、0.2 mg/ml、0.5 mg/ml 添加すると濃度依存的に4本線のESRシグナルの減少が起こった。0.5 mg/ml の添加では、•OH のESRシグナルはほとんど認められなくなった(Fig. 26 B)。同様に白虎加人参湯を最終濃度0.1 mg/ml、0.2 mg/ml、0.5 mg/ml 添加すると濃度依存的に•OH のESRシグナルの減少が起こった。0.5 mg/ml の添加では、•OH のESRシグナルが消失した(Fig. 26 C)。すなわち、八味地黄丸および白虎加人参湯共に、•OH の不活性化作用のあることが認められた。

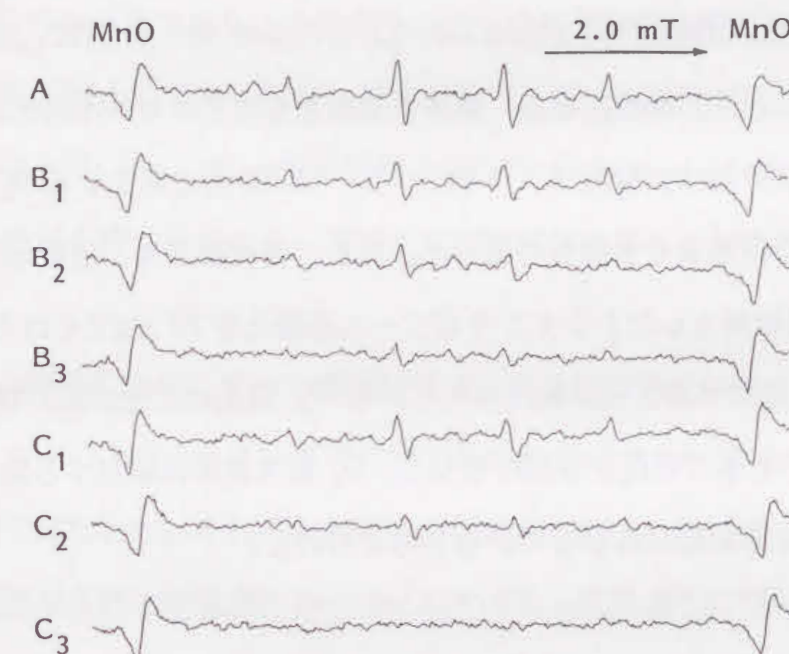


Fig.26 八味地黄丸および白虎加人参湯添加によるDMO-OHのESRスペクトルの変化  
A: コントロール  
B<sub>1</sub>: 八味地黄丸 0.1 mg/ml  
B<sub>2</sub>: 八味地黄丸 0.2 mg/ml  
B<sub>3</sub>: 八味地黄丸 0.5 mg/ml  
C<sub>1</sub>: 白虎加人参湯 0.1 mg/ml  
C<sub>2</sub>: 白虎加人参湯 0.2 mg/ml  
C<sub>3</sub>: 白虎加人参湯 0.5 mg/ml



### 3. 8. 考察

桂枝茯苓丸、桃核承気湯に DPPH ラジカル捕捉作用、 $O_2^-$  の不活性化作用、赤血球の脂質過酸化と溶血の抑制作用が認められた。これらの 50% 活性( $IC_{50}$ )を比較した結果を Table 12 に示した。桂枝茯苓丸、桃核承気湯ともにラジカル不活化、脂質過酸化および溶血の抑制作用は同程度で、キサンチン - XOD 系で発生する  $O_2^-$  の不活性化作用が他の系での作用よりも強力であった。また、桂枝茯苓丸、桃核承気湯はキサンチン - XOD を開始剤としたレシチンリポソーム過酸化を 25  $\mu g$  でそれぞれ  $81.4 \pm 4.3\%$ 、 $86.5 \pm 1.0\%$  抑制することが認められている<sup>82)</sup>。以上のことから、桂枝茯苓丸、桃核承気湯は  $O_2^-$  を不活性化するだけでなく、 $O_2^-$  発生経路に關与する鉄の不活化などの作用で強力な抑制効果を示していると考えられる。

Table 12 各反応系における漢方方剤の抗酸化活性の比較

	不活化反応		赤血球	
	DPPH・	$O_2^-$	脂質過酸化	溶血
桂枝茯苓丸	20	17	59	22
桃核承気湯	17	11	31	27
当帰芍薬散	14	50	47	60

各反応系において 50% 効果を示す各化合物の濃度( $IC_{50}$ )を  $\mu g/ml$  で示している。

当帰芍薬散にはラジカル捕捉作用は認められなかったが、桂枝茯苓丸、桃核承気湯と同程度の  $O_2^-$  の不活性化作用、脂質過酸化および溶血の抑制作用が認められた (Table 12)。しかし、他のラジカル關与の反応系において桂枝茯苓丸、桃核承気湯とは異なり当帰芍薬散が抑制作用を示さなかったことより<sup>83)</sup>、当帰芍薬散の示した  $O_2^-$  の

不活性化作用や脂質過酸化および溶血の抑制作用は、活性酸素への直接的な作用ではないと推測される。

糖尿病は全身性の疾患であり、その発生の予防や合併症の治療が重要な課題となっている。催糖尿病薬として知られている STZ と AX は、実験糖尿病を作るために広く使用されているが<sup>84, 85)</sup>、これらの糖尿病発症作用は *all-rac- $\alpha$ -*トコフェロールなどのラジカル消去作用を持つものによって阻止又は軽減されることが報告されている<sup>86)~88)</sup>。

一方、脾は、ほかの組織に比べて活性酸素に対する防御機能が弱く、活性酸素による攻撃を受けやすいと言われている<sup>70)~72)</sup>。活性酸素やフリーラジカルのみが糖尿病発症の原因ではないが、それらが糖尿病自体の発生や、それに伴って出現する種々の合併症の発現ならびに増悪機序の一つとして考えられるようになってきている。さらに、糖尿病と発症や進展に活性酸素やフリーラジカルが關与していると思われるが、血糖のコントロールの悪い糖尿病患者では、血中過酸化脂質値は高値で、血小板の脂質過酸化も亢進し<sup>89)</sup>、逆にインスリン投与により血糖のコントロールをうけている糖尿病患者では、赤血球中 SOD が高値で血漿中過酸化脂質値は低く他の活性酸素消去系酵素活性は低下傾向にあり、赤血球中 SOD の誘導が活性酸素産生に続発する過酸化脂質産生の増加を防いでいる可能性が示唆されている<sup>90)</sup>。このことから、糖尿病治療薬の八味地黄丸と白虎加人参湯に  $\cdot OH$  の不活化作用が認められたことは、糖尿病治療方剤が活性酸素およびフリーラジカルの不活化作用により二次的な種々の組織障害を減少させる効果がある可能性が示唆された。

桂枝茯苓丸、桃核承気湯、十全大補湯、人参養栄湯には今回の実験においてラジカル不活性化作用が認められた桂皮が含まれているが (Table 9)、各方剤 0.1 mg/ml 中の桂皮の含有量は 0.006 ~ 0.03 mg/ml である。この濃度では、桂皮は  $O_2^-$  の生成を抑制しない (Fig. 22)。すなわち、これらの方剤が示した活性酸素消去作用は、桂皮一生涯



による作用ではなく各方剤の構成生薬、例えば抗酸化作用が認められている芍薬、牡丹皮、桃仁<sup>73, 91)</sup>などとの相互作用によると考えられる。

丁子には没食子酸誘導体が、桂皮にはカテキン誘導体のように芳香性生薬には、多くのタンニンが含まれ、これらタンニンの多くには、活性酸素捕捉作用や脂質過酸化抑制作用が認められている<sup>92)~94)</sup>。また、芳香性生薬に含まれる精油成分 cinnamaldehyde(桂皮)、eugenol(丁子)にラジカル捕捉作用や  $O_2^-$  の不活性化作用が認められている<sup>95, 96)</sup>ことから、桂皮、丁子の示す作用は、含有するタンニンや、精油成分によると考える。ラジカル捕捉作用は認められないが、 $O_2^-$  の不活性化作用を認めた茴香には、ESR 実験系での $\cdot OH$ の不活性化作用が認められている<sup>97)</sup>。

以上のように、活性酸素に作用する方剤が何種類か認められた。さらに詳細な検討は必要であるが、方剤の示す薬理作用と活性酸素に対する作用の関連が期待できる。

## 第4章 総括

### 4. 1. コーヒー酸とその構造類似体の抑制作用と作用機作

酸素は生体エネルギーである ATP の生合成に欠くことのできない気体であるが、この酸素を生物が利用するときには種々の型に活性化されている。制御された条件下で生成する活性酸素は生体防御、生体反応に機能する場合があります、また生成した活性酸素で障害をもたらさないように酵素(SOD、GSH-Px、カタラーゼ)や低分子抗酸化物質(尿酸、GSH、ビリルビン)などが酸素障害を防いでいる。厳しい光、酸素ストレス下で生息している植物には種々の抗酸化物質を含んでいると考えられ、また植物に多く含まれているビタミン類の血中濃度と発癌との間に反比例関係があることを示す疫学的データがあり、ビタミン類も抗酸化の観点からも摂取の必要性が論じられている。このように、生体内および天然物の抗酸化剤が注目されているのは、天然抗酸化物質を摂取することが、生体内での脂質過酸化反応により生じるラジカルを不活化したり、生体系での過酸化脂質の生成を阻止できるのではないかと期待からである。その目的のためには、まず物質が実際に生体内脂質過酸化反応を抑制できるのかどうかの検討の必要がある。そこで、多くの *in vitro* における系で、さらに *in vivo* における系で研究を進めた。

トリプトファンとコーヒー酸がアミド結合した Caffeoyltryptophan については、コーヒー豆に含有されていることが知られているだけで、本研究で初めて生理活性の報告を行った。*in vitro* において強力な  $O_2^-$  およびラジカル不活化作用、脂質過酸化の初期反応の抑制、赤血球膜の脂質過酸化および溶血の抑制作用を認めた。特にラジカル不活化作用は、*all-rac-α*-トコフェロールより強力であった。トリプトファンは今回実験を行った全ての系において作用を示さなかった。このことから、Caffeoyltryptophan の示す作用はカテコール部位によることが推測される。



*in vitro* において、コーヒー酸、クロロゲン酸および 3,5-DCQA に低濃度(1 ~ 50  $\mu$ M) でラジカル不活化作用、 $O_2^-$  不活化作用、脂質過酸化の初期反応の抑制、赤血球膜の脂質過酸化および溶血の抑制作用を認めた。その中でも 3,5-DCQA が最も強力な活性を示した(Table 8)。さらに、クロロゲン酸は *in vivo* においてラジカル反応により誘導される脂質過酸化反応を抑制した。各反応系における活性がほぼ同程度であることより(Table 8)、コーヒー酸やクロロゲン酸の作用機序を考えると、活性酸素直接の作用に基づくことが明らかになった。また、3,5-DCQA が最も強力な活性を示していることや、ESR で確認されているクロロゲン酸のラジカル生成物の報告<sup>93)</sup> などから、コーヒー酸、クロロゲン酸、3,5-DCQA および Caffeoyltryptophan はカテコール部位で作用を示すことが、さらに、溶血抑制の形態学的観察よりコーヒー酸、クロロゲン酸、3,5-DCQA および Caffeoyltryptophan などは、膜の脂質過酸化の抑制による膜の安定化により溶血を抑制することが示唆された。

活性酸素やフリーラジカルの障害を防ぐのには、産生したラジカルの捕捉安定化作用により、開始反応や連鎖反応を阻止するという機構(Fig.27)が考えられている<sup>57)</sup>。この作用を示す化合物には、脂溶性と水溶性で作用を発揮するものに区別される。脂溶性の代表として *all-rac*- $\alpha$ -トコフェロールがよく知られ、水溶性の代表としてアスコルビン酸がよく知られている。*all-rac*- $\alpha$ -トコフェロールは生体膜内部で進行する連鎖反応を強力に抑制されている<sup>98)</sup>。クロロゲン酸、3,5-DCQA および Caffeoyltryptophan は水溶性部位(キナ酸)を含む化合物(Fig. 2、3)なので、脂溶性と水溶性どちらの反応系においても作用することが推測される。実際今回の実験において、これらの化合物は全ての系において強力な抗酸化作用を示した(Table 8)。従って、クロロゲン酸、3,5-DCQA および Caffeoyltryptophan は両親媒性の抗酸化剤で、生体膜の膜内部ではなく表面で効果的にラジカルを不活性化すると考えられる。

一方、香辛料や生薬として用いられている薔金に含まれるクルクミノイドにも赤血

球膜の脂質過酸化抑制作用を認めたが、クルクミノイドの構成成分であるフェルラ酸、桂皮酸、*p*-クマル酸には赤血球膜の脂質過酸化抑制作用を認めなかったことから、これらの化合物とクルクミノイドでは抗酸化の作用部位が異なることが示された。このことは、上記に示したようにクロロゲン酸、3,5-DCQA および Caffeoyltryptophan がコーヒー酸と同じ作用部位で抗酸化作用を示すこととは異なっていた。

以上の結果と、ESR で確認されているクロロゲン酸のラジカル生成物の安定性<sup>92)</sup> などから、コーヒー酸類がラジカル反応の開始反応および連鎖反応の抑制により抗酸化作用を示し、赤血球の溶血や肝障害などを防御することを認めた(Fig. 27)。



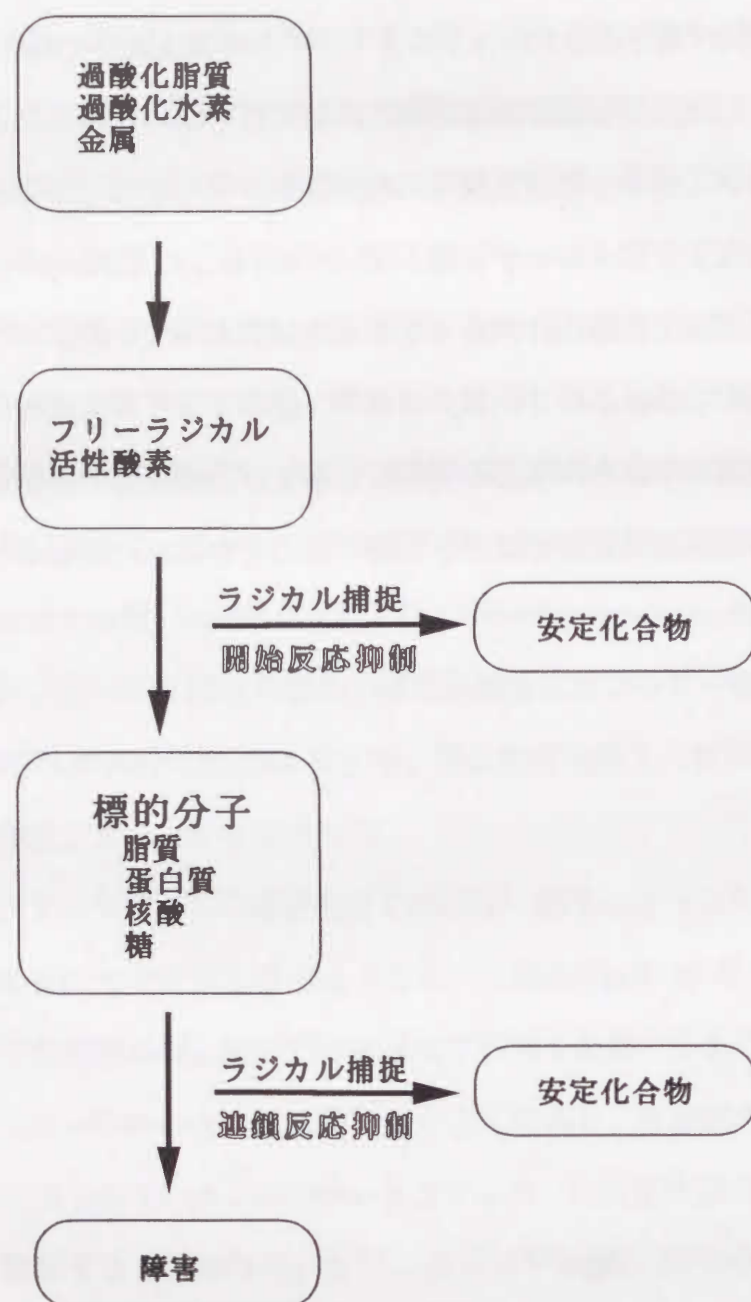


Fig. 27 コーヒー酸類の抑制反応機構

#### 4. 2. 漢方方剤の抑制作用

数種の構成生薬より成る漢方薬の効果は、各々の生薬から溶出した成分の作用を合わせたもので、一般に植物を原料とするこれらの成分の中に抗酸化作用を示すものがしばしば見受けられる。漢方薬は成人病や婦人病などでその役割が強く求められているが、それらの疾患には活性酸素が関与すると言われている動脈硬化や血管障害などの疾患が多いことから、治療に用いられている漢方薬の効能と含有する抗酸化成分とは無縁ではないと考えられる。瘀血が血液の粘性の上昇により起こり、赤血球膜の脂質過酸化と血液の粘性に関連性が指摘され<sup>66, 67)</sup>、瘀血症が赤血球の脂質過酸化と深く関与していると思われる。駆瘀血剤である桂枝茯苓丸、桃核承気湯にラジカルおよび  $O_2^-$  の不活性化作用、赤血球膜の脂質過酸化および溶血抑制作用を認め、これらの作用がラジカル不活性化作用に基づいていることを明らかにした。また、発症および増悪機序に活性酸素が深く関与していると言われている糖尿病の治療薬である八味地黄丸、白虎加人参湯に  $\cdot OH$  不活性化作用を認めた。

芳香族生薬のうち桂皮、丁子、茴香にラジカルおよび  $O_2^-$  の不活性化作用を認めた。当帰芍薬散のように抗酸化成分(桂皮)が含有されていても、すべての活性酸素の反応系において作用を示すわけではなかった。すなわち、抗酸化成分が含有されているからといって漢方方剤が抗酸化作用を示すとは限らず、さらに方剤の示す活性が含有する抗酸化成分の濃度よりは強力で、方剤は構成成分の相乗的、拮抗的な働きにより複雑な作用を示すことが認められた。また、活性酸素が深く関与している疾患に用いられている漢方方剤には強力なラジカル不活性化作用を示すものが多く、治療効果とラジカル不活性化作用が深く関与していることが示唆された。



## 謝辞

本論文の御校閲ならびに御指導を賜るとともに、種々の御便宜をお計らい下さいました徳島大学薬学部、樋口富彦教授に衷心より御礼申し上げます。

また、本稿を御査読していただき、懇切なる御助言を賜りました徳島大学薬学部福澤健治教授ならびに高石喜久教授に深甚なる感謝の意を表します。

論文をまとめるにあたり、御指導を賜るとともに、種々の御便宜をお計らい下さいました徳島大学薬学部柴田洋文博士に深甚なる感謝の意を表します。

本研究に際して、御指導ならびに御鞭撻を賜りました和歌山県立医科大学城戸亮名誉教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究に際して、御指導、御協力頂きました和歌山大学森下比出子教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究に際し、有益な御助言とご協力を賜りました関西鍼灸短期大学戸田静男教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究に際し、貴重な御助言とご協力を賜りました関西鍼灸短期大学木村通郎教授に謹んで感謝の意を表します。

## 引用文献

- 1) McCord, J. M. and Fridovich, I. : Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J. Biol. Chem., 244, 6049-6055, 1969
- 2) 浅田浩二 : 活性酸素の生物に対する作用. 代謝, 15, 3-11, 1978
- 3) 手塚統夫 : 食細胞による活性酸素の生成. 最新医学, 39, 1328-1341, 1984
- 4) Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. : フリーラジカルと生体 (松尾光芳、嵯峨井勝、吉川俊一訳). 学会出版センター, 東京, 1988
- 5) 大柳善彦 : SOD と活性酸素調節剤. 日本医学館, 東京, 1989
- 6) Moslen, M. T. and Smith, C. V. : Free radical mechanisms of tissue injury. CRC press, U.S.A., 1992
- 7) 小林一雄 : 活性酸素—生物での生成・消去・作用の分子機構— (中野稔、浅田浩二、大柳善彦編). 共立出版, 東京, p.26-31, 1988
- 8) 吉川敏一 : 過酸化脂質と生体 (内山充、松尾光芳、嵯峨井勝編). 学会出版センター, 東京, p.289-313, 1985
- 9) 大柳善彦 : SOD と活性酸素調節剤. 日本医学館, 東京, p.225-229, 1989
- 10) Clifford, M. N. : The composition of green and roasted coffee beans. Process Biochem., 10, 20-29, 1975
- 11) Rees, D. I. and Theaker, P. D. : High pressure liquid chromatography of chlorogenic acid isomers in coffee. 8th ASIC Abidjan, 79-84, 1979
- 12) Brandl, W. and Herrmann, K. : Occurrence of chlorogenic acids in potatoes. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 178, 192-194, 1984
- 13) Walter W. M., Purcell, A. E. and McCollum, G. K. : Use of high-pressure liquid chromatography for analysis of sweet potato phenolics. J. Agric. Food Chem., 27,



- 938-941, 1979
- 14) Matheis, G. and Belitz, H. D. : Studies on enzymatic browning of potatoes (*solanum tuberosum*) II. The quantitative relationship between browning and its causative factors. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 163, 186-190, 1977
  - 15) Ullah, M. R. and Jain, J. C. : Seasonal variations in the chlorogenic acid content of tea. *J. Sci. Food Agric.*, 31, 355-358, 1980
  - 16) Van Buren, J., De Vos, L. and Pilnik, W. : Measurement of chlorogenic acid and flavonol glycosides in apple juice by a chromatographic-fluorometric method. *J. Food Sci.*, 38, 656-658, 1973
  - 17) 大西基代、戸田静男、東家一雄、黒岩共一、木村通郎 : ヨモギおよび艾の高速液体クロマトグラフィーによる分析. 関西鍼灸短期大学年報, 7, 24-26, 1991
  - 18) Johnson, G. and Schaal, L. A. : Relation of chlorogenic acid to scab resistance in potatoes. *Science*, 115, 627-629, 1952
  - 19) Rice, E. L. : アレロパシー (八巻敏雄、安田環、藤井義晴共訳), 学会出版センター, 東京, p.302-351, 1991
  - 20) 奥田拓男、波多野力、縣 功、西部三省 : シソ科植物のタンニン活性成分 (第 1 報). 薬学雑誌, 106, 1108-1111, 1986
  - 21) Moritani, S., Nomura, M., Takeda, Y. and Miyamoto, K. : Cytotoxic Components of *Bardanae Fructus* (Goboshi). *Biol. Pharma. Bull.*, 19, 1515-1517, 1996
  - 22) Yoshikawa, M., Shimada, H., Saka, M., Yoshizumi, S., Yamahara, J. and Matsuda, H. : Medicinal Foodstuffs. V. Moroheiya. (1) : Absolute stereostructures of corchoionosides A, B, and C, histamine release inhibitors from the leaves of Vietnamese *Corchorus olitorius* L. (Tiliaceae). *Chem. Pharm. Bull.*, 45, 464-469, 1997
  - 23) Basnet, P., Matsushige, K., Hase, K., Kadota, S. and Namba, T. : Four di-*O*-caffeoyl quinic acid derivatives from propolis. Potent hepatoprotective activity in experimental liver injury models. *Biol. Pharm. Bull.*, 19, 1479-1484, 1996
  - 24) Koshihara, Y., Neichi, T., Murota, S., Lao, A., Fujimoto, Y. and Tatsuno, T. : Caffeic acid is a selective inhibitor for leukotriene biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 792, 92-97, 1984
  - 25) Clark, W. G. and Geissman, T. A. : Potentiation of effects of epinephrine by flavonoid ("vitamin P"-like) compounds. Relation of structure to activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 95, 363-381, 1949
  - 26) 田村三郎、大熊和彦、林忠彦 : 油脂の酸化防止に関する研究 (第 2 報) Caffeic 及び Dihydrocaffeic ester 類の抗酸化性. 日本農芸化学会誌, 26, 410-412, 1952
  - 27) Thiel, K. D., Helbig, B., Klöcking, R., Wutzler, P., Sprössing, M. and Schweizer, H. : Vergleich der in-vitro-wirksamkeit von ammomiuhumat und enzymatisch oxidiertes chlorogen- und kaffeesaure gegenüber Herpesvirus hominis. *Pharmazie*, 36, 50-53, 1981
  - 28) König, B. and Dustmann, J. H. : The caffeoylics as a new family of natural antiviral compounds. *Naturwissenschaften*, 72, 659-661, 1985
  - 29) Helbig, B., Klocking, R. and Wutzler, P. : Anti-herpes simplex virus type 1 activity humic acid-like polymers and their o-diphenoli compounds. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 8, 265-273, 1997
  - 30) Kono, Y., Shibata, H., Kodama, Y., Ueda, A. and Sawa, Y. : Chlorogenic acid as a natural scavenger for hypochlorous acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 217, 972-978, 1995
  - 31) Robinson, W. E. Jr., Reinecke, M. G., Abdel-Malek, S., Jia, Q., and Chow, S. A. :



- Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit HIV integrase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 6326-6331, 1996
- 32) Robinson, W. E. Jr., Cordeiro, M., Abdel-Malek, S., Jia, Q., Chow, S. A., Reinecke, M. G. and Mitchell, W. M. : Dicaffeoylquinic acid inhibitors of human immunodeficiency virus integrase : Inhibition of the core catalytic domain of human immunodeficiency virus integrase. Mol. Pharmacol., 50, 846-855, 1996
- 33) Matsuse, I. T., Nakabayashi, T., Lim, Y. A., Hussein, G. M. E., Miyashiro, H., Kakiucji, N., Hattori, M., Stardjo, S. and Shimotohno, K. : A human immunodeficiency virus protease inhibitory substance from *Swietenia mahagoni*. Phytotherapy Research, 11, 433-436, 1997
- 34) Terasawa, K., Torizuka, K., Tosa, H., Ueno, M., Hayashi, T. and Shimizu, M. : Rheological studies on "oketsu" syndrome I. The blood viscosity and diagnostic criteria. J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU, 3, 98-104, 1986
- 35) Pfafferott, C., Meiselman, H. J. and Hochstein, P. : The effect malondialdehyde on erythrocyte deformability. Blood, 59, 12-15, 1982
- 36) 林 純子、井藤英喜 : 糖尿病におけるフリーラジカルと動脈硬化. 活性酸素・フリーラジカル, 4, 178-183, 1993
- 37) Morishita, H., Takai, Y., Yamada, H., Fukuda, F., Sawada, M., Iwahashi, H. and Kido, R. : Caffeoyltryptophan from green robusta coffee beans. Phytochemistry, 26, 1195-1196, 1987
- 38) Murata, M., Okada, H. and Homma, S. : A novel hydroxycinnamic acid derivative of coffee bean. 16th. ASIC. Kyoto, 199-207, 1995
- 39) Toda, S., Miyase, T., Arichi, H., Tanizawa, H. and Takino, K. : Natural anti-oxidants. III : Antioxidative compounds isolated from the rhizome of *Curcuma*

- longa* L. Chem. Pharm. Bull., 33, 1725-1728, 1985
- 40) Kiso, Y., Sizuki, Y., Watanabe, N., Oshima, Y. and Hikino, H. : Antihepatotoxic principles of *Curcuma longa* Rhizomes. Planta Med., 49, 185-187, 1983
- 41) Morishita, H., Iwahashi, H., Osaka, N. and Kido, R. : Chromatographic separation and identification of naturally occurring chlorogenic acids by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry. J. Chromatogr., 315, 253-260, 1984
- 42) Blois, M. S. : Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1120, 1958
- 43) Terao, J., Karasawa, H., Arai, H., Nagao, A., Suzuki, T. and Takama, K. : Peroxyl radical scavenging activity of caffeic acid and its related phenolic compounds in solution. Biosci. Biotech. Biochem., 57, 1204-1205, 1993
- 44) 今成登志男、広田元子、宮崎元一、早川和一、田村善蔵 : Superoxide dismutase 活性測定法の改良. 医学のあゆみ, 101, 496-497, 1977
- 45) Tien, M., Morehouse, L. A., Bucher, J. R. and Aust, S. D. : The multiple effects of ethylenediaminetetraacetate in several model lipid peroxidation systems. Arch. Biochem. Biophys., 218, 450-458, 1982
- 46) 福沢健治、寺尾純二 : 過酸化脂質実験法. 廣川書店, 東京, p.79-80, 1990
- 47) 小友 進、藤平栄一 : 抗炎症剤の赤血球膜安定化作用 (第 1 報) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によるイヌ赤血球の溶血現象と Lipid Peroxidation におよぼす影響. 薬学雑誌, 90, 1347-1354, 1970
- 48) Mengel, C. E. and Kann, H. E. Jr. : Effects of *in vivo* hyperoxia on erythrocytes. III : *In vivo* peroxidation of erythrocyte lipid. J. Clin. Invest., 45, 1150-1158, 1966
- 49) Cannan, R. K. : Proposal for adoption of an international method and standard solution for hemoglobinometry, specifications for preparation of the standard solution,



- and notification of availability of a reference standard solution. Am. J. Clin. Pathol., 44, 207-210, 1965
- 50) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, N. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by tiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem., 95, 351-358, 1979
  - 51) Butler, T. C. : Reduction of carbon tetrachloride *in vivo* and reduction of carbon tetrachloride and chloroform *in vitro* by tissues and tissue constituents. J. Pharmacol. Exp. Ther., 134, 311-319, 1961
  - 52) Rao, K. S., Glende, E. A. Jr. and Recknagel, R. O. : Effect of drug pretreatment on carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in rat liver microsomal lipids. Exp. Mol. Pathol., 12, 324-331, 1970
  - 53) Lai, E. K., McCay, P. B., Noguchi, T. and Fong, K. L. : *In vivo* spin-trapping of trichloromethyl radicals formed from CCl<sub>4</sub>. Biochem. Pharmacol., 28, 2231-2235, 1979
  - 54) Shertzer, H. G., Berger, M. L. and Tabor, M. W. : Intervention in free radical mediated hepatotoxicity and lipid peroxidation by indole-3-carbinol. Biochem. Pharmacol., 37, 333-338, 1988
  - 55) Booth, A. N. and Emerson, O. H., Jones, F. T. and DeEds, F. : Urinary metabolites of caffeic and chlorogenic acids. J. Biol. Chem., 229, 51-59, 1957
  - 56) Goldstein, D. S., Stull, R., Markey, S. P., Marks, E. S. and Keiser, H. R. : Dihydrocaffeic acid : A common contaminant in the liquid chromatographic-electrochemical measurement of plasma catecholamines in man. J. Chromatogr., 311, 148-153, 1984
  - 57) 寺尾純二 : フラボノイド類の抗酸化活性とその評価. 食品と開発, 28, 10-13, 1994
  - 58) 三木正之、美濃真 : 赤血球におけるラジカル反応とラジカルスカベンジャーとしてのビタミン E. フリーラジカルの臨床, 2, 149-159, 1987
  - 59) Yamamoto, Y., Niki, E., Kamiya, Y. and Shimasaki, H. : Oxidation of lipids. Oxidation of phosphatidylcholines in homogeneous solution and in water dispersion. Biochim. Biophys. Acta, 795, 332-340, 1984.
  - 60) Yamamoto, Y., Niki, E., Eguchi, J., Kamiya, Y. and Shimasaki, H. : Oxidation of biological membranes and its inhibition. Free radical chain oxidation of erythrocyte ghost membranes by oxygen. Biochim. Biophys. Acta, 819, 29-36, 1985
  - 61) Laranjinha, J., Almeida, L. and Madeira, V. : Reduction of ferrylmyoglobin by dietary phenolic acid derivatives of cinnamic acid. Free Rad. Biol. Med., 19, 329-337, 1995
  - 62) Laranjinha, J., Vieira, O., Almeida, L. and Madeira, V. : Inhibition of metmyoglobin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent low density lipoprotein lipid peroxidation by naturally occurring phenolic acids. Biochem. Pharmacol., 51, 395-402, 1996
  - 63) Larson, R. A. : The antioxidants of higher plants. Phytochemistry, 27, 969-978, 1988
  - 64) Sreejayan and Rao, M. N. A. : Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. J. Pharm. Pharmacol., 46, 1013-1016, 1994
  - 65) Sugiyama Y., Kawakishi, S. and Osawa, T. : Involvement of the  $\beta$ -diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. Biochem. Pharmacol., 52, 519-525, 1996
  - 66) Soudamini, K. K., Unnikrishnan, M. C., Soni, K. B. and Kuttan, R. : Inhibition of lipid peroxidation and cholesterol levels in mice by curcumin. Indian J. Physiol. Pharmacol., 36, 239-243, 1992
  - 67) 原中瑠璃子、長谷川律子、米山良樹、福井紀子 : 桃核承気湯エキスの加齢に及ぼす影響. 日本東洋医学会誌, 42, 147, 1991



- 68) 細川 康、米沢司郎、武田篤彦：十全大補湯および補中益気湯による放射線障害の防護. 和漢医薬学会誌, 2, 260-261, 1985
- 69) 細川 康、米沢司郎、武田篤彦：放射線と併用した十全大補湯および小柴胡湯の担癌マウスに対する制癌作用. 和漢医薬学会誌, 3, 314-315, 1985
- 70) 糠塚 守、川田 純、桜井 弘：ESR とフリーラジカル(西川弘恭、吉川敏一編集). 日本医学館, 東京, p.161-165, 1989
- 71) 朝山光太郎：脾臓とフリーラジカル. フリーラジカルの臨床, 1, 日本医学館, 56-63, 1987
- 72) Asayama, K., Kooy, N. W. and Burr, I. M. : Effects of vitamin E deficiency and selenium deficiency on insulin secretory reserve and free radical scavenging systems in islets : Decrease of islet manganosuperoxide dismutase. J. Lab. Clin. Med., 107, 459-464, 1986
- 73) 戸田静男、谷澤久之、有地 滋、滝野吉雄：生薬メタノールエキスのリノール酸空気酸化抑制作用. 薬学雑誌, 104, 394-397, 1984
- 74) 織田真智子、阿部博子、有地 滋：赤血球変形に対する桂枝茯苓丸の作用. 和漢医薬学会誌, 1, 243-248, 1984
- 75) Itoh, T., Terasawa, K., Morimoto, Y., Tosa, H. and Hiyama, Y. : Effects of Keishi-bukuryo-gan on microcirculation of bulbar conjunctiva in normal subjects. J. Med. Pharm. WAKAN-YAKU, 5, 206-210, 1988
- 76) 原中瑠璃子、長谷川律子、福井紀子、臼倉幸宏、中川滋木：桃核承気湯エキスの脂質、グルタチオン代謝に及ぼす影響. 和漢医薬学会誌, 7, 298-299, 1990
- 77) 有地 滋、岩永正子、谿 忠人：漢方方剤の血液粘度低下作用－瘀血剤の臨床治験－. 医学と薬学, 9, 901-920, 1983
- 78) Terasawa, K., Torizuka, K., Tosa, H., Ueno, M., Hayashi, T. and Shimizu, M. :

- Rheological studies on "oketsu" syndrome I. The blood viscosity and diagnostic criteria. J. Med. Pharm. Soc. WAKAN-YAKU, 3, 98-104, 1986
- 79) Pfaffert, C., Meiselman, H. J. and Hochstein, P. : The effect malondialdehyde on erythrocyte deformability. Blood, 59, 12-15, 1982
- 80) 金田尚志、植田伸夫：過酸化脂質実験法. 医歯薬出版, 東京, p.148-150, 1984
- 81) Iwashita, H., Ishii, T., Sugata, R. and Kido, R. : The effects of caffeic acid and its related catechols on hydroxyl radical formation by 3-hydroxyanthranilic acid, ferric chloride and hydrogen peroxide. Arch. Biochem. Biophys., 276, 242-247, 1990
- 82) 戸田静男、大西基代、木村通郎、戸田知子：活性酸素によるレシチンリポソームに対する桂枝茯苓丸、桃核承気湯の抑制作用. 和漢医薬学会誌, 9, 134-136, 1992
- 83) 戸田静男、木村通郎、大西基代、戸田知子：駆瘀血剤のリン脂質、リポ蛋白過酸化に対する作用. 和漢医薬学会誌, 8, 318-319, 1991
- 84) Rakieten, N., Rakieten, M. L. and Nadkarni, M. V. : Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. Cancer Chemother. Rep., 29, 91-98, 1963
- 85) Agarwal, M. K. : Streptozotocin ; mechanisms of action. FEBS Lett., 120, 1-3, 1980
- 86) Robbins, M. J., Sharp, R. A., Slonim, A. E. and Burr, I. M. : Protection against streptozotocin-induced diabetes by superoxide dismutase. Diabetologia, 18, 55-58, 1980
- 87) Fischer, L. J. and Hamburger, S. A. : Inhibition of alloxan action in isolated pancreatic islets by superoxide dismutase, catalase, and a metal chelator. Diabetes, 29, 213-216, 1980
- 88) Slonim, A. E., Surber, M. L., Page, D. L., Sharp, R. A. and Burr, I. M. : Modification of chemically induced diabetes in rats by vitamin E. Supplementation



- minimizes and depletion enhances development of diabetes. *J. Clin. Invest.*, 71, 1282-1288, 1983
- 89) 富野康日己: 糖尿病性腎症とフリーラジカル. 活性酸素・フリーラジカル, 3, 45-51, 1992
- 90) 朝山光太郎: 脾臓とフリーラジカル. フリーラジカルの臨床, 1, 日本医学館, 56-63, 1987
- 91) 有地 滋、久保道德、谿 忠人、中村秀雄、今津千恵子、門河敏明、永本典生、難波健輔、西村温樹: 桃仁の研究(第3報) 桃仁の抗炎症性蛋白成分 PR-B の抗活性酸素作用. 薬学雑誌, 105, 895-901, 1985
- 92) Okuda, T., Kimura, Y., Yoshida, T., Hatano, T. Okuda, H. and Arichi, S. : Studies on the activities of tannins and related compounds of medicinal plants and drugs. I. Inhibitory effects on lipid peroxidation in mitochondria and microsomes of liver. *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 1625-1631, 1983
- 93) 藤田勇三郎、駒越圭子、丹羽ゆかり、上原郁恵、原 令子、森 廣美、奥田拓男、吉田隆志: タンニン及びフラボノイドによる自動酸化抑制機構(第3報). 生薬中のタンニンによるリノール酸メチルの自動酸化抑制機構. 薬学雑誌, 108, 528-837, 1988
- 94) Yoshida, T, Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Komagoe, K., Fujita, Y. and Okuda, T. : Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 1919-1921, 1989
- 95) 太田静行: 油脂食品の劣化とその防止. 幸書房, 東京, p.127-134, 1979
- 96) Rajakumar, D. V. and Rao, M. N. A. : Dehydrozingerone and isoeugenol as inhibitors of lipid peroxidation and as free radical scavengers. *Biochem. Pharmacol.*, 46,

2067-2072, 1993

- 97) 戸田静男、大西基代、木村通郎: 芳香性生薬の活性酸素生成抑制作用. 和漢医薬学会誌, 8, 55-58, 1991
- 98) Hukuzawa, K., Ikebata, W. and Sohmi, K. : Location, antioxidant and recycling dynamics of -tocopherol in liposome membranes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 39, S9-S22, 1993



## 付記

本研究は以下の論文をまとめたものである。

Inhibition *in vitro* linoleic acid peroxidation and haemolysis by caffeoyltryptophan.

M. Ohnishi, H. Morishita, S. Toda, Y. Yase and R. Kido.

Phytochemistry, 47, 1215-1218(1998)

Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and haemolysis.

M. Ohnishi, H. Morishita, H. Iwahashi, S. Toda, Y. Shirataki, M. Kimura and R. Kido.

Phytochemistry, 36, 579-583(1994)

Action of curcuminoids on the hemolysis and lipid peroxidation of mouse erythrocytes induced by hydrogen peroxide.

S. Toda, M. Ohnishi, M. Kimura and K. Nakashima

J. Ethnopharmacology, 23, 105-108(1988)

糖尿病治療薬の活性酸素に対する作用

大西基代、戸田静男、菅田良仁、東家一雄、黒岩共一、木村通郎

医学のあゆみ, 158, 447-448(1991)

Actions of chinese herbal medicines Keishibukuryo-gan and Tougakujiyouki-to on the hemolysis and lipid peroxidation of mouse erythrocytes induced by hydrogen peroxide.

S. Toda, M. Ohnishi and M. Kimura

J. Ethnopharmacology, 27, 221-225(1989)

芳香性生薬の活性酸素に対する作用 (1)

戸田静男、大西基代、木村通郎

和漢医薬学会誌, 7, 372-373(1990)





論文審査の結果の要旨

報告番号	乙 薬 第 34 号	氏 名	大 西 基 代
審査委員	主 査	樋口 嘉彦 (印)	
	副 査	福澤 健治 (印)	
	副 査	高石 喜久 (印)	

学位論文題目

コーヒー酸とその構造類似体および漢方方剤の活性酸素に対する抑制作用と作用機作

審査結果の要旨

本論文では、コーヒー酸とその構造類似体および漢方方剤の活性酸素に対する作用を調べ、主として以下の事実を明らかにしている。

1. コーヒー酸とその構造類似体であるCaffeoyltryptophan, クロロゲン酸及び3,5-Dicaffeoylquinic acid (3,5-DCQA)は、ラジカルおよび $O_2^-$ の不活性化作用、リノール酸ミセルの脂質過酸化抑制作用、赤血球の脂質過酸化抑制作用及び溶血抑制作用を有することを初めて示した。これらの抗酸化作用は、3,5-DCQAが最も強かったこと、そしてp-クマル酸、桂皮酸、バニリン酸、フェルラ酸、プロトカテキュ酸、トリプトファンには、このような抗酸化作用は見られなかったことから、これらの活性発現には、caffeoyl基の存在が必須であると結論している。

2. 糖尿病の治療薬である八味地黄丸、白虎加人参湯にラジカル不活性化作用、瘀血症の治療薬である桂枝茯苓丸、桃核承気湯に、ラジカルおよび $O_2^-$ の不活性化作用、赤血球膜の脂質過酸化抑制作用および溶血抑制作用があることを初めて示し、漢方方剤の効能とラジカル捕捉作用に深い関連があることを明らかとしている。

本研究で得られたこれらの知見は新規のものであり、植物に含まれる成分並びに漢方方剤についての作用を数多くの活性試験法を用いて証明しており、その社会的意義は非常に高いと考える。

このように本論文は食品として日常人が摂取している数多くの成分、漢方方剤の作用機作を明らかにしたものであり、博士論文として妥当であると判定する。